

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA TROPICAL**

ESEQUIEL SANTOS

**INFLUÊNCIA DA MINERALOGIA DO SOLO E DA
MICROBIOTA ASSOCIADA À RIZOSFERA DE
ADUBOS VERDES NA FITORREMEDIAÇÃO DO
HERBICIDA SULFENTRAZONE**

**São Mateus - ES
Fevereiro de 2017**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA TROPICAL

**INFLUÊNCIA DA MINERALOGIA DO SOLO E DA
MICROBIOTA ASSOCIADA À RIZOSFERA DE
ADUBOS VERDES NA FITORREMEDIAÇÃO DO
HERBICIDA SULFENTRAZONE**

ESEQUIEL SANTOS

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical, para obtenção do título de Mestre em Agricultura Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Ribeiro Pires

São Mateus - ES
Fevereiro de 2017

Dados Internacionais de Catalogação na publicação (CIP)
(Divisão de Biblioteca Setorial do CEUNES - BC, ES, Brasil)

S237i Santos, Esequiel, 1974-
Influência da mineralogia do solo e da microbiota associada à rizosfera de adubos verdes na fitorremediação do herbicida sulfentrazone / Esequiel Santos. – 2017.
79 f. : il.

Orientador: Fábio Ribeiro Pires.

Coorientador: Fernando Barboza Egreja Filho; João Carlos Madalão.

Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical) –
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro Universitário Norte do Espírito Santo.

1. Bioensaio. 2. Canavalia. 3. Crotalaria. 4. Biorremediação. 5. Microrganismos. 6. DNA. I. Pires, Fábio Ribeiro. II. Egreja Filho, Fernando Barboza. III. Madalão, João Carlos. IV. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro Universitário Norte do Espírito Santo. V. Título.

CDU: 63


ESEQUIEL SANTOS

**INFLUÊNCIA DA MINERALOGIA DO SOLO E DA
MICROBIOTA ASSOCIADA À RIZOSFERA DE ADUBOS VERDES NA
FITORREMEDIAÇÃO DO HERBICIDA SULFENTRAZONE**

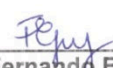
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agricultura Tropical.

Aprovada em 23 de fevereiro de 2017.

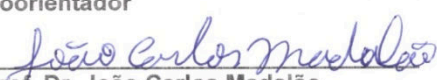
COMISSÃO EXAMINADORA




Prof. Dr. Fábio Ribeiro Pires
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador




Prof. Dr. Fernando Barboza Egreja
Filho
Universidade Federal de Minas Gerais
Coorientador



Prof. Dr. João Carlos Madalão
Universidade Federal do Espírito Santo
Coorientador



Prof. Dr. Diego Lang Burak
Universidade Federal do Espírito Santo



Prof.ª Dr.ª Andréia Barcelos Passos
Lima Gontijo
Universidade Federal do Espírito Santo

AGRADECIMENTOS

A Deus, o pai criador de todas as coisas, tendo a convicção de que: “[...] Nele vivemos, nos movemos e existimos [...]” (BIBLIA, Atos, 17.28)

À minha querida esposa Cleyde Tavares e meus filhos João Guilherme e Pedro Henrique pela paciência em minhas ausências muitas vezes e mesmo assim sempre com amor e incentivo durante toda a realização desse trabalho.

A Universidade Federal do Espírito Santo e ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical pela oportunidade de realização do curso e disponibilização da sua estrutura para a condução do trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), pelo apoio financeiro ao projeto desenvolvido.

Ao Prof. Dr. Fábio Ribeiro Pires, pela mentoria, amizade, incentivo, compreensão, pelos valiosos “puxões de orelha”, atenção e tempo dedicados, muito grato pelo direcionamento e acompanhamento em todo o percurso deste trabalho.

À Profa. Dra. Irene da Silva Coelho da UFRRJ pela parceria na realização da análise da diversidade bacteriana.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical pela paciência e dedicação.

Aos membros da banca examinadora: Dr. Diego Lang Burak, Dr. Fernando Barboza Egreja Filho, Dr. João Carlos Madalão e Dra. Andreia Barcelos P. L. Gontijo pelo atendimento ao convite e valiosas sugestões de melhoria ao trabalho.

Às colegas: Ana Carolina Ross Pinheiro e Amanda Duim Ferreira pela indispensável parceria na realização deste trabalho.

Aos Doutores: João Carlos Madalão, Alessandra Ferreira Belo, Dione Cardoso e Paulo Roberto da Rocha Junior pela colaboração e disposição em sempre ajudar com valiosas sugestões a este trabalho, pela amizade, pelos conselhos, pela paciência e alegrias.

Aos colegas e amigos: Gleison Oliosí, Douglas Viana, Vinícius, Kerwin, Raphaela Correia, Benedicto Barbosa e Gabriel, pela colaboração ao trabalho.

Aos técnicos dos laboratórios: Helder, Francisco e Joel, pela paciência e colaboração dispensadas a este trabalho.

Aos novos amigos que recebi durante o tempo de realização desse trabalho, tenho um carinho e respeito por todos. Sou grato a Deus por vocês. Obrigado pelo carinho, amizade e apoio e pela oportunidade de aprender e conviver com vocês.

BIOGRAFIA

ESEQUIEL SANTOS, Filho de Orlando Santos e Dalila Viana Santos, nasceu em Nova Venécia - ES, no dia 18 de julho de 1974. Em 1996 ingressou em uma sociedade no ramo de beneficiamento de produtos da agricultura. Graduou-se em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Espírito Santo em 2001. Nos anos de 2002, 2003, 2006 e 2007, foi profissional na área da educação. No ano de 2003 concluiu o curso em Gestão e Manejo Ambiental do Programa de Pós-Graduação em Gestão Ambiental em Sistemas Florestais, em nível de Especialização, pela Universidade Federal de Lavras-MG. No ano de 2015 iniciou o Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical, em nível de Mestrado, pela Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), submetendo-se à defesa de dissertação em fevereiro de 2017.

SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT	vii
1.CAPÍTULOS	viii
1.1 EFEITO DA MINERALOGIA DE TRÊS SOLOS NA FITORREMEDIAÇÃO DE SULFENTRAZONE	ix
Resumo	ix
Abstract	x
Introdução	1
Material e Métodos	5
Resultados e Discussão	9
Conclusões	20
Referências	21
1.2 ATRIBUTOS DA MICROBIOTA ASSOCIADA À RIZOSFERA DE <i>Canavalia</i> <i>ensiformis</i> E <i>Crotalaria juncea</i> NA FITORREMEDIAÇÃO DO HERBICIDA SULFENTRAZONE	27
Resumo	27
Abstract	28
Introdução	29
Material e Métodos	32
Resultados e Discussão	37
Conclusões	57
Referências	58
Conclusão Geral	64
2. APÊNDICE	65

RESUMO

SANTOS, Esequiel; M.sc; Universidade Federal do Espírito Santo; fevereiro de 2017; **Influência da mineralogia do solo e da microbiota associada à rizosfera de adubos verdes na fitorremediação do herbicida sulfentrazone;**

Orientador: Fábio Ribeiro Pires; Coorientadores: Fernando Barboza Egreja Filho e João Carlos Madalão.

Diversos fatores podem interferir no desempenho da fitorremediação de herbicidas no solo, em particular a mineralogia e a atividade microbiana. Com o objetivo de realizar investigações em condições edáficas, utilizando as espécies *Canavalia ensiformis* e *Crotalaria juncea*, foi avaliado o efeito da mineralogia e da rizosfera na fitorremediação do herbicida sulfentrazone. Na primeira etapa, os tratamentos foram compostos pela combinação entre três tipos de solos, com texturas diferentes, variando quanto à mineralogia da fração argila dominada por um tipo de mineral (caulinita, hematita e gibbsita) e duas doses de sulfentrazone (0 e 400 g ha⁻¹), dispostos em esquema fatorial 3 x 3 x 2, em DBC, com três repetições. Para o bioensaio, foi semeada uma espécie bioindicadora de resíduo de sulfentrazone no solo, o milheto (*Pennisetum glaucum*). Os resultados demonstraram que a movimentação do herbicida foi maior no solo caulínítico e a retenção do herbicida foi maior no solo hematítico. A fitorremediação foi mais eficiente no pré-cultivo da *C. ensiformis* no solo gibbsítico, reduzindo em 28% a carga de sulfentrazone aplicada. Não houve resultado para o solo hematítico. No solo caulínítico, a *C. ensiformis* reduziu a massa total de sulfentrazone em aproximadamente 11% e a *C. juncea* em 19%. Na segunda etapa, avaliou-se também a contribuição microbiana rizosférica dessas mesmas espécies na fitorremediação do sulfentrazone. Os tratamentos foram compostos pela combinação de dois solos rizosféricos (feijão de porco e crotalária) e um não-rizosférico com quatro níveis de contaminação pelo herbicida sulfentrazone (0, 200, 400 e 800 g ha⁻¹), dispostos em esquema fatorial 3 x 4. Foram avaliados evolução de CO₂, carbono da biomassa microbiana (CBM), quociente metabólico (qCO₂), componentes biométricos e fitotoxidade no *P. glaucum*, em bioensaio e cromatografia líquida do solo. Os resultados indicaram que o cultivo das espécies fitorremediadoras promoveu incremento da atividade microbiana e foi verificado que os perfis genéticos bacterianos foram formados de acordo com a

planta e a característica de solo (rizosférico e não rizosférico), ampliando os conhecimentos a respeito das associações entre as plantas e microrganismos.

Palavras-chave: *Canavalia ensiformis*, *Crotalaria juncea*, Biorremediação, Microrganismos, DNA, Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)

ABSTRACT

SANTOS, Esequiel; M.sc; Federal University of Espírito Santo; February 2017;
Influence of soil mineralogy and the microbiota associated with the rhizosphere of green manures on the phytoremediation of the herbicide sulfentrazone;

Advisor: Fabio Ribeiro Pires; Co-Advisors: Fernando Barboza Egreja Filho, and João Carlos Madalão.

Several factors may interfere with phytoremediation performance of herbicides in soil, in particular mineralogy and microbial activity. The effect of mineralogy and rhizosphere on the phytoremediation of the herbicide sulfentrazone was evaluated in order to carry out research in soil conditions using *Canavalia ensiformis* and *Crotalaria juncea* species. In the first stage, the treatments were composed by a combination of three types of soils, with different textures, varying the mineralogy of clay fraction dominated by one type of mineral (kaolinite, hematite and gibbsite) and two doses of sulfentrazone (0 and 400 g ha⁻¹), arranged in a 3 x 3 x 2 factorial scheme, in DBC, with three replications. For the bioassay, a bioindicator species of sulfentrazone residue was seeded in the soil, millet (*Pennisetum glaucum*). The results showed that the herbicide movement was higher in the kaolinite soil and herbicide retention was higher in the hemattic soil. Phytoremediation was more efficient in the preculture of *C. ensiformis* in the gibbsite, reducing by 28% the applied sulfentrazone load. There was no result for hematological soil. In the kaolinite soil, *C. ensiformis* reduced the total sulfentrazone mass by approximately 11% and *C. juncea* by 19%. In the second stage, it was also evaluated the rhizospheric microbial contribution of these same species in the phytoremediation of sulfentrazone. The treatments were composed by the combination of two rhizospheric soils (pork and crotalaria) and one non-rhizosphere with four levels of sulfentrazone herbicide (0, 200, 400 and 800 g ha⁻¹), arranged in a 3 x 4 factorial scheme. Evolution of CO₂, microbial biomass carbon (CBM), metabolic quotient (*q*CO₂), biometric components and phytotoxicity in *P. glaucum* were evaluated in bioassay and soil liquid chromatography. The results indicated that the cultivation of phytoremediate species promoted an increase in microbial activity and it was verified that the profiles bacterial genotypes were formed according to the plant and soil characteristics (rhizospheric and non - rhizospheric), increasing knowledge about the associations between plants and microorganisms.

Key words: *Canavalia ensiformis*, *Crotalaria juncea*, Bioremediation, Microorganisms, DNA, Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

1.CAPÍTULOS

1.1 EFEITO DA MINERALOGIA DE TRÊS SOLOS NA FITORREMEDIAÇÃO DE SULFENTRAZONE

Resumo

Atualmente, cerca de 40% da superfície terrestre vem sendo utilizados para a agricultura. Sem deixar de considerar outros fatores, a produtividade tem crescido, em grande parte, pela utilização de herbicidas que podem contaminar solos e águas subterrâneas. Esses resíduos se acumulam no meio ambiente, tornando-se um problema grave em todo o mundo. Com o objetivo de realizar investigações em condições edáficas, utilizando as espécies *C. ensiformis* e *C. juncea*, avaliou-se o efeito dos constituintes minerais do solo na fitorremediação do herbicida sulfentrazone. Na primeira etapa, os tratamentos foram compostos pela combinação entre três solos, variando quanto à mineralogia da fração argila dominada por um tipo de mineral (caulinita, hematita e gibbsita), duas plantas fitorremediadoras e uma testemunha e duas doses de sulfentrazone (0 e 400 g ha⁻¹), dispostos em esquema fatorial 3 x 3 x 2, em blocos casualizados, com três repetições. O solo foi acondicionado em colunas de plástico com 15 cm de diâmetro e 48 cm de altura, contendo 9,2 kg de solo por coluna para o solo caulinitico, 9,1 kg de solo por coluna para o solo hematítico e 8,2 kg de solo por coluna para o solo gibbsítico. O herbicida foi aplicado e em seguida semeadas as espécies fitorremediadoras (*C. ensiformis* ou *C. juncea*). Após 75 dias, as espécies fitorremediadoras foram cortadas rente ao solo e o solo separado em camadas de 12 cm, destinadas a avaliar a mobilidade do herbicida no perfil dos solos. O resíduo de sulfentrazone nos solos foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência, confirmado também por bioensaios com planta bioindicadora de resíduo, o milheto (*P. glaucum*). Os resultados demonstraram que a movimentação do herbicida foi maior no solo caulinitico, independentemente dos cultivos. A retenção do herbicida foi maior no solo hematítico, independentemente dos cultivos. A fitorremediação foi mais eficiente no pré-cultivo do *C. ensiformis* no solo gibbsítico, reduzindo em 28% a carga de sulfentrazone aplicada. No solo caulinitico, o *C. ensiformis* reduziu a massa total de sulfentrazone em aproximadamente 11% e a *C. juncea* em 19%.

Palavras-chave: *Canavalia ensiformis*, *Crotalaria juncea*, Bioensaio, Fitotoxicidade.

Abstract

Currently, about 40% of the land surface has been used for agriculture. Notwithstanding other factors, productivity has been largely driven by the use of herbicides that can contaminate soil and groundwater. This waste accumulates in the environment, becoming a serious problem all over the world. The effect of the mineral constituents of the soil on phytoremediation of the herbicide sulfentrazone was evaluated in order to carry out investigations in soil conditions using the species *C. ensiformis* and *C. juncea*. In the first stage, the treatments were composed by a combination of three soils, varying in the mineralogy of clay fraction dominated by a mineral type (kaolinite, hematite and gibbsite), two phytoremediation plants and one control and two doses of sulfentrazone (0 and 400 G ha⁻¹), arranged in a 3 x 3 x 2 factorial scheme, in a randomized block design, with three replications. The soil was conditioned in plastic columns with 15 cm of diameter and 48 cm of height, containing 9.2 kg of soil per column for kaolinite soil, 9.1 kg of soil per column for hematological soil and 8.2 kg Of soil per column for gibbsite soil. The herbicide was applied and then seeded the phytoremediate species (*C. ensiformis* or *C. juncea*). After 75 days, the phytoremediate species were cut close to the soil and soil separated into 12 cm slices, to evaluate the mobility of the herbicide in the soil profile. The sulfentrazone residue in the soils was determined by high performance liquid chromatography, also confirmed by bioassays with bioindicator residue plant, millet (*P. glaucum*). The results showed that the herbicide movement was higher in the kaolinite soil, independently of the crops. The retention of the herbicide was higher in the hemattic soil, independently of the crops. Phytoremediation was more efficient in the *C. ensiformis* in the gibbsite, reducing the applied sulfentrazone load by 28%. In the kaolinite soil, *C. ensiformis* reduced the total sulfentrazone mass by approximately 11% and *C. juncea* by 19%.

Key words: *Canavalia ensiformis*, *Crotalaria juncea*, Bioassay, Phytotoxicity.

Introdução

O aumento da população mundial, que poderá ultrapassar os 9 bilhões em 2050 (FAO, 2016), e consequentemente do consumo, está impondo demandas sem precedentes à agropecuária e aos recursos naturais essenciais à existência no planeta. Atualmente, cerca de 40% da superfície terrestre vem sendo utilizados para a agricultura (FOLEY, 2011). Sem deixar de considerar outros fatores, a produtividade tem crescido, em grande parte, pela utilização de defensivos agrícolas (OLIVEIRA & BRIGHENTI, 2011).

O uso intensivo de moléculas xenobióticas pela agricultura é uma fonte potencial de contaminação das águas superficiais e subterrâneas (MENEZES, 2006). A elevada utilização de herbicidas de longa persistência no ambiente resulta em grandes extensões de áreas contaminadas (MADALÃO et al., 2016).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, tendo relevante importância para o agronegócio brasileiro. A área plantada na safra 2015/16 foi em torno de 8,7 milhões de hectares (CONAB, 2016). No manejo de plantas daninhas dessa cultura são utilizados grandes volumes de herbicidas, sendo em torno de 12,9% do montante comercializado em 2013 no Brasil (IEA, 2014).

Para essa cultura, das 33 moléculas de herbicidas registradas no Brasil, descritas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, a maioria (23), são de ação residual, aplicados como pré-emergentes. Muitos apresentam longo poder residual, principalmente aqueles indicados para acultura plantada no final da época das chuvas (BLANCO et al., 2010).

O sulfentrazone, *2',4'-dichloro-5-(4-difluoromethyl-4,5-dihydro-3-methyl-5-oxo-1H1,2,4-triazol-1-yl) methanesulfonanilide*, do grupo químico das triazolinonas, é um herbicida para aplicação preferencialmente em pré-emergência, controlando várias espécies de plantas daninhas, mono e dicotiledôneas, das culturas da cana-de-açúcar, soja, café e eucalipto, além do seu uso em pátios industriais. Ele apresenta solubilidade em água de 490 mg L⁻¹ e pressão de vapor de 1x10⁻⁹ mm Hg a 25 °C. No solo, a mobilidade é moderada, de baixa adsorção, com K_{oc}= 43, pK_a= 6,56 e K_{ow}= 1,48, sendo a decomposição microbiana a via mais importante de degradação do produto no solo, sua meia-vida em solos brasileiros, em média, de 180 dias (RODRIGUES & ALMEIDA, 2005).

Este herbicida apresenta comportamento de ácido fraco, ou seja, com características aniônicas, sofrendo ionização em solução aquosa, em função do seu pK_a e do pH do meio. Dessa forma, pequenas variações no pH provocam grandes mudanças nas proporções das concentrações das formas ionizadas e moleculares na solução do solo, influenciando de forma significativa o processo de sorção desse produto (RIZZI, 2003).

Complementando com Harper (1994), os herbicidas ácidos são aqueles cujas formas moleculares são capazes de ionizar-se, liberando próton, ficando carregados negativamente. A ionização é altamente dependente do pH do solo e do pK_a do herbicida. Quando o pH da solução do solo for igual ao pK_a do herbicida, as concentrações das formas não dissociada (molecular) e dissociada (ionizada) serão iguais.

Além do pH do solo, o material de origem do solo, os tipos de minerais predominantes na fração argila, os grupos funcionais e a quantidade da matéria orgânica, além das condições climáticas do local onde o herbicida foi aplicado, são responsáveis pelas variações na mobilidade de herbicidas nos solos (WEBER et al., 2004).

A lixiviação tem sido apontada como a principal via de contaminação das águas subterrâneas e os principais processos que controlam a lixiviação dos agrotóxicos no solo são sua degradação e sorção. Ambos os processos são fortemente afetados pelas propriedades físicas e químicas do solo, com especial ênfase para o teor de matéria orgânica e por condições tais como temperatura e umidade (SILVA, 2009).

Para ser lixiviado o composto químico deve estar na solução do solo, livre ou adsorvido a pequenas partículas, como argilas, ácidos fúlvicos e húmicos de baixa massa molar (OLIVEIRA & BRIGHENTI, 2011).

Alguns outros fatores que afetam a lixiviação de um determinado agrotóxico são sua retenção pelos colóides do solo, o teor de água do solo, a meia-vida e o potencial de remobilização, a topografia ou declividade da área, a intensidade da chuva ou irrigação após aplicação e o manejo do solo (OLIVEIRA & BRIGHENTI, 2011).

Moléculas altamente adsorvidas aos colóides do solo tendem a apresentar um baixo potencial de lixiviação e, conseqüentemente, um alto potencial de transporte via escoamento superficial (LOURENÇATO, 2010).

Monquero et al. (2010) avaliaram a lixiviação do sulfentrazone e imazapique sob simulação de chuva de 40 e 80 mm, em diferentes profundidades (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 cm) e pH (4,7, 5,3 e 6,0) de um Latossolo Vermelho Distroférrico e de um Latossolo Vermelho Distrófico. A atividade residual do sulfentrazone, na precipitação de 80 mm, foi constatada até 40 cm de profundidade, sendo elevada no solo de textura média e menos pronunciada no de textura argilosa, independentemente do pH. No solo argiloso com pH 6,0 houve maior lixiviação em todas as profundidades quando comparado ao mesmo solo com pH 4,7.

A sorção refere-se à atração e retenção das moléculas ou íons à superfície dos sólidos e constitui um processo fundamental para a dinâmica dos produtos fitossanitários nos solos. Esses produtos apresentam comportamento complexo, resultante de numerosas interações com os constituintes das diferentes frações do solo (FREITAS et al., 2014).

No que concerne especificamente ao teor e o tipo de argila predominante, estes têm efeito relevante na biodisponibilidade do composto (McBRIDE, 1994). Em determinada textura, a constituição mineralógica do solo terá efeito pronunciado no processo adsorptivo. A fração argila de solos tropicais é basicamente formada por minerais secundários, como silicatados, óxidos, hidróxidos e oxi-hidróxidos de ferro e alumínio. Os óxidos de ferro contribuem para a adsorção de ânions, em razão da protonação que ocorre dependendo do pH, porém, participam do processo sortivo em menor escala que os minerais silicatados 2:1. Minerais de argila 1:1 como a caulinita, por possuírem baixas CTC e superfície específica, contribuem pouco para a adsorção de herbicidas (PIRES et al., 2009).

A diferença qualitativa das argilas foi observada por Weber & Scott (1966), trabalhando com o herbicida paraquat, para o qual observaram maior adsorção pela montmorilonita do que pela caulinita, reduzindo a biodisponibilidade para a absorção por plântulas de pepino. A adsorção à montmorilonita reduziu a zero a biodisponibilidade para o pepino e na caulinita houve ainda pequena dessorção.

No caso de material orgânico, há ligação entre a matéria húmica e os herbicidas, quando esses estão carregados positivamente.

Werlang (2005), avaliando a sorção do sulfentrazone nos principais constituintes da fração argila de solos tropicais e em substrato orgânico, concluiu que, dentre os principais constituintes da CTC de solos tropicais estudados, a caulinita (argila silicatada de baixa atividade), a ferridrita (óxido de ferro amorfo) e a goethita

(óxido de ferro cristalino) foram as que menos contribuíram na sorção do sulfentrazone, e os ácidos húmicos (constituente da matéria orgânica), hematita (óxido de ferro cristalino) e bauxita (óxidos de alumínio) foram os principais responsáveis pela sorção desse herbicida, porém, não foi testada associação com plantas.

O uso de defensivos agrícolas tem proporcionado, juntamente com os demais avanços tecnológicos, incrementos produtivos e redução nas perdas ocasionadas por pragas, doenças e plantas daninhas nas mais diversas culturas de interesse agrícola. Todavia, a utilização desses compostos de modo indiscriminado representa alto risco de contaminação ambiental (VIVIAN, et al., 2006).

Uma das técnicas empregadas como alternativa para contornar e ou, reduzir o problema da contaminação ambiental é a fitorremediação, que envolve o emprego de plantas e sua microbiota associada e de amenizantes do solo, além de práticas agronômicas que, se aplicadas em conjunto, removem, imobilizam ou tornam os contaminantes inofensivos ou menos tóxicos no ecossistema (CUNNINGHAM et. al., 1996).

Madalão et al. (2012), selecionaram as espécies *C. ensiformis* e *C. juncea* como potenciais fitorremediadoras de sulfentrazone. A importância agronômica dessas espécies é que, além de exibirem tolerância ao herbicida e reduzirem seus níveis no solo, fixam nitrogênio, são de fácil propagação/aquisição e cultivo e não são espécies daninhas (PIRES et al., 2003). Todavia, para um melhor efeito fitorremediador é necessário tempo mínimo de cultivo de 75 dias (MADALÃO et al., 2012) e densidade populacional mínima de 20 plantas de *C. ensiformis* e 120 plantas *C. juncea* por m⁻² (FERRAÇO et al., 2017).

No solo, quando o herbicida é aplicado em pré-emergência, este pode sofrer sorção, lixiviação e/ou degradação por processos físicos, químicos e biológicos, além de ser absorvido pelas plantas daninhas e, ou, cultivadas (PRATA & LAVORENTI, 2000;ROSSI, et al., 2005).

A constituição mineralógica tem grande influência nos processos de biodisponibilidade de xenobióticos no solo. Dessa forma, objetivou-se avaliar o efeito de três diferentes mineralogias do solo na fitorremediação do herbicida sulfentrazone.

Material e Métodos

O experimento foi realizado entre abril e agosto de 2016, sendo instalado em casa de vegetação localizada na Fazenda Experimental do Centro Universitário Norte do Espírito Santo, da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUNES/UFES) em São Mateus-ES, coordenadas geográficas 18° 43" S; 30° 51" O e altitude de 39 metros.

Ele foi composto por dezoito tratamentos em delineamento experimental em blocos casualizados, com três repetições, em esquema fatorial 3 x 3 x 2, sendo os fatores: três solos, cada um com mineralogia da fração argila dominada por um tipo de mineral (caulinita, hematita e gibbsita), presença das plantas fitorremediadoras feijão de porco (*C. ensiformis*), crotalária (*C. juncea*) e uma testemunha sem plantas e duas doses do sulfentrazone (0 e 400 g ha⁻¹).

Os solos caulinitico e hematítico foram coletados na zona rural do município de Pinheiros, ES (18°28'6.38"S; 40°18'17.01"O e 18°25'11.4"S; 40°12'29.66"O, respectivamente) e o gibbsitico em São Gotardo, MG (19°22'43"S; 46°08'35"O) em áreas sem histórico de aplicação de herbicidas, na profundidade de 0-20 cm. Amostras de solos foram caracterizadas quanto à composição química, física e teor de matéria orgânica (TABELA 1), conforme Embrapa (1997). Além disso, separaram-se as frações areia, silte e argila. Foram preparadas amostras da fração argila para análise por difratometria de raios-x (DRX).

A DRX foi realizada nas seguintes condições instrumentais: tubo de cobre, varredura de 4 a 80° 2θ ao passo de 4° min⁻¹ (FIGURAS 1, 2 e 3 no APÊNDICE).

Os solos também foram caracterizados quanto ao seu comportamento hídrico, visando à determinação da capacidade de campo através do método da coluna de solo, seguindo metodologia modificada de Fernandes & Sikes (1968).

TABELA 1: Caracterização química e textural dos solos utilizados no experimento

Análise Química							
Solo	pH(após calagem)	P	K	Na	Ca	Mg	Al
	H ₂ O	----- mg dm ⁻³ -----			-----cmolc dm ⁻³ -----		
Caulinítico	6,26	72,27	254,00	23,00	2,52	0,50	0,00
Hematítico	6,86	12,08	148,00	17,00	2,01	0,59	0,00
Gibbsítico	7,02	1,02	96,00	2,00	2,59	0,56	0,00
	H + Al	SB	t	T	V	m	M.O.
	-----cmol _c dm ⁻³ -----				-----%-----	-----dag kg ⁻¹ -----	
Caulinítico	2,89	3,77	3,77	6,66	56,62	0,00	2,13
Hematítico	3,30	3,06	3,06	6,36	48,09	0,00	1,08
Gibbsítico	4,21	3,41	3,41	7,61	44,73	0,00	2,47
Análise física / Classificação textural							
Solo	Argila	Areia	Silte	Classificação (SBCS)			
	g kg ⁻¹						
Caulinítico	244	688	68	Franco-argilo-arenosa			
Hematítico	621	186	193	Muito argilosa			
Gibbsítico	433	21	546	Argilossiltosa			

Para instalação do experimento, os solos foram peneirados em malha de 4 mm e receberam quantidade de calcário necessária para elevar a saturação por bases a 70% conforme recomendação de Prezotti et al. (2007) para a cultura do feijoeiro. Posteriormente, foram acondicionados em colunas de PVC de 15 cm de diâmetro e 48 cm de altura, revestidas internamente com parafina, recebendo na extremidade inferior a vedação com manta de drenagem (Figura 4). A coluna foi acoplada a um funil e mangueira. Procedeu-se o preenchimento das colunas de forma que os solos apresentassem valores de densidade os mais próximos possíveis, sendo utilizados 9,2 kg de solo por coluna para o solo caulinitico, 9,1 kg de solo por coluna para o solo hematítico e 8,2 kg de solo por coluna para o solo gibbsítico, resultando nas densidades de 1,16 g cm⁻³, 1,14 g cm⁻³ e 1,03 g cm⁻³, respectivamente.

Em seguida, foi feita a aplicação do herbicida sulfentrazone com o auxílio de um micro-pulverizador, aplicando-se dose equivalente a 400 g ha⁻¹ e volume de calda

equivalente a 200 L ha^{-1} . O produto comercial utilizado no experimento foi o Boral[®] 500 SC, fabricado pela FMC. A semeadura das espécies vegetais remediadoras foi realizada um dia após a aplicação do sulfentrazone, adotando-se seis sementes por coluna para a crotalária e três sementes por coluna para o feijão de porco. O desbaste foi realizado 15 dias após a semeadura, deixando-se duas plantas de crotalária e uma de feijão de porco por coluna, conforme a densidade ideal estabelecida por Ferraço et al. (2017).

Foram determinadas curvas de drenagem para cada solo, empregando-se a metodologia modificada de Fernandes & Sikes (1968).

A umidade do solo foi mantida próximo a 80% da capacidade de campo, com base nas curvas de drenagem. O lixiviado produzido foi coletado semanalmente em garrafas pet de 500 mL e armazenado em freezer até o momento da análise cromatográfica.



FIGURA 4: Vista geral do experimento. São Mateus-ES, 2016.

Aos 75 dias após a semeadura (DAS), as plantas foram cortadas rente ao solo, ocasião em que foram avaliadas altura e massa fresca da parte aérea, sendo utilizadas também para cromatografia. As colunas foram seccionadas a cada 12 cm, utilizando-se uma máquina de serra makita[®] separando-se amostras de solo e raízes para cromatografia.

A análise cromatográfica foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência

(CLAE), utilizando um cromatógrafo modelo Waters 2695 equipado com detector UV/DAD, auto-injetor e forno para colunas. A condição cromatográfica foi otimizada e validada de acordo com o descrito por Ohmes & Mueller (2007), e foi utilizada: fase móvel constituída de acetonitrila - ácido fosfórico 0,1% VN (60 : 40); coluna RP-18, 250 x 4,6 mm, 5 μm ; fluxo de 1 mL min^{-1} ; injeção de 10 μL , detecção em 220 nm e temperatura da coluna de 30 $^{\circ}\text{C}$. As soluções-padrão foram preparadas a partir do padrão de sulfentrazone com teor declarado de 99,8% na concentração de 0,01 mg mL^{-1} .

Os resíduos de sulfentrazone no solo foram determinados por extração com 80 mL de metanol para cada 40 g de solo, após agitação por 16h a 180 rotações por minuto (rpm) em agitadora orbital da TECNAL®. Após a etapa de agitação, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 3.200 rpm para separação em centrífuga rotor basculante (ângulo variável) baby® I modelo 206-BL, cruzeta horizontal com 08 tubos de 15 mL – FCR 2318. Em seguida, uma parte do extrato sobrenadante foi retirado com auxílio de seringa e filtrado em membrana de PTFE de 0,45 μm , da Millipore®, para “vials” de 1,5 mL, os quais foram submetidos à análise cromatográfica.

Para a determinação dos resíduos de sulfentrazone na parte aérea e raiz das plantas fitorremediadoras, o material vegetal foi submetido a extração por maceração. As amostras previamente congeladas foram retiradas do freezer e, após atingirem a temperatura ambiente foram secas em papel toalha e pesadas em balança analítica SHIMADZU® AUY 220, seguindo metodologia de Barbosa, (2001) & Serafim et al., (2007), sendo utilizadas 5 g de material vegetal para 50 mL de metanol. Em seguida, macerou-se a mistura até a completa dispersão da amostra. Após a etapa de maceração, as amostras foram filtradas em papel de filtro, e posteriormente centrifugadas por 15 minutos a 3.200 rpm para separação em centrífuga rotor basculante (ângulo variável) baby® I modelo 206-BL, cruzeta horizontal com 08 tubos de 15mL – FCR 2318. Parte do sobrenadante foi retirado com auxílio de seringa e filtrado em membrana de PTFE de 0,45 μm , da Millipore®, para “vials” de 1,5 mL, os quais foram submetidos à análise cromatográfica.

Para confirmar a presença do herbicida, além da cromatografia, foi utilizada a metodologia de bioensaios com planta-teste sensível ao sulfentrazone. Para tanto, parte do solo de cada segmento das colunas foi acondicionado em copos de plástico com capacidade de 150 cm^3 e foi semeado o milho ADR300 (*P. glaucum*). Segundo

Blanco & Velini (2005), esta metodologia de bioensaios é considerada adequada para detecção de resíduos no solo do herbicida sulfentrazone.

Aos 30 DAS do milho foram avaliadas: a altura de plantas (cm) de milho, tomando-se como base para medição o meristema apical; a fitotoxicidade, avaliada visualmente, em %, baseada em critérios qualitativos, segundo ALAM (1974), que utiliza uma escala percentual de notas, onde 0 (zero) corresponde à nenhuma injúria na planta e 100 (cem) à morte das plantas. Também foi determinada a massa seca da parte aérea (mg), com secagem do material em estufa a 70 °C até peso constante, aproximadamente 72 h.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e nos casos em que o teste F foi significativo aplicou-se o teste de Tukey a 5% para a comparação das médias, com o auxílio do programa SISVAR (FERREIRA, 2014).

Resultados e Discussão

O tipo de mineral predominante em cada solo não influenciou no desenvolvimento das espécies remediadoras. Não foi observada diferença estatística significativa na interação entre os fatores solos x plantas remediadoras para variável altura, obtendo-se altura média igual a 98,94 cm para o feijão de porco e 131,22 cm para a crotalária (Tabela 2). Quanto à massa fresca da parte aérea, o feijão de porco apresentou valor médio de 98,33 g/planta e a crotalária 40,28 g/planta (Tabela 2).

TABELA 2. Altura e Massa fresca da parte aérea de plantas de *Canavalia ensiformis* e *Crotalaria juncea*, cultivadas em três solos com diferentes mineralogias, aos 75 dias após semeadura (DAS)

Solo	Altura (cm)		Massa Fresca/planta (g)	
	<i>C. ensiformis</i>	<i>C. juncea</i>	<i>C. ensiformis</i>	<i>C. juncea</i>
Caulinitico	116,83 aA	136,42 aA	95,67 aA	38,67 aB
Hematítico	86,83 aA	125,75 aA	99,00 aA	40,67 aB
Gibbsítico	93,17 aA	131,50 aA	100,33 aA	41,50 aB
C.V (%)	24,78			

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula para colunas e maiúsculas para linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Não foram observados sintomas de intoxicação nas plantas de *C. ensiformis* e *C. juncea*, comprovando a tolerância dessas espécies ao sulfentrazone, que é uma característica altamente desejável para que uma espécie seja utilizada como

fitorremediadora. Na análise cromatográfica dos extratos das raízes e parte aérea dessas plantas, não foram encontrados resíduos do sulfentrazone.

Os resultados analíticos das quantidades de sulfentrazone no solo, no lixiviado e aqueles obtidos no bioensaio com milho (Tabelas 3 e 4) demonstraram que no solo caulinitico (e mais arenoso) o sulfentrazone se movimentou por toda a coluna de solo, sendo retido na profundidade de 0-12 cm 60% da massa aplicada, 30% entre 12-24 cm, 0% entre 24-36 cm, 12,1% na camada de 36-48 cm e apenas 1,3% abaixo dessa profundidade (no lixiviado). Considerou-se o total do tratamento testemunha para o solo caulinitico como o total aplicado. Esses percentuais apontados pela cromatografia são confirmados pelos resultados do bioensaio para intoxicação (Figura 5) altura (Figura 6) e massa seca da parte aérea das plantas de milho (Figura 7).

TABELA 3. Quantidade de sulfentrazone encontrada em quatro profundidades de solo contaminado com dose de 400g ha⁻¹ do herbicida sulfentrazone, após o cultivo prévio de *Canavalia ensiformis*, *Crotalaria juncea* e testemunha (sem planta)

Prof. (cm)	Solos	Massa de sulfentrazone (µg)		
		Feijão de porco	Crotalaria	Testemunha
0-12	Caulinitico	799,2 (89%)	730,0 (81%)	541,4 (60%)
	Hematítico	-	959,1 (106,8%)	-
	Gibbsítico	-	-	-
12-24	Caulinitico	-	-	275,5(30%)
	Hematítico	-	-	-
	Gibbsítico	-	-	-
24-36	Caulinitico	-	-	-
	Hematítico	-	-	-
	Gibbsítico	248,9 (30,3%)	-	-
36-48	Caulinitico	-	-	111,3 (12,1%)
	Hematítico	-	-	-
	Gibbsítico	337,7 (41,2%)	-	-

*valores entre parênteses representam a porcentagem do total aplicado, baseado na testemunha do tratamento no solo caulinitico.

TABELA 4. Quantidade de sulfentrazone encontrada em lixiviado coletado durante 75 dias de cultivo de *Canavalia ensiformis*, *Crotalária juncea* e testemunha (sem planta) em solo contaminado com dose de 400g ha⁻¹ do herbicida sulfentrazone

Solos	µg de sulfentrazone na solução coletada		
	Feijão de porco	Crotalária	Testemunha
Caulinítico	0,734 (0,08%)	1,486 (0,2%)	11,805 (1,3%)
Hematítico	0,495 (0,06%)	-	-
Gibbsítico	0,022 (0,002%)	0,300 (0,03%)	1,222 (0,14%)

* valores entre parênteses representam a porcentagem do total aplicado, baseado na testemunha.

Nos demais solos, o tratamento testemunha não mostrou sulfentrazone em nenhuma das profundidades do solo, aparecendo 0,14% do aplicado no lixiviado do solo gibbsítico. Esse resultado é muito intrigante e pode sugerir um desaparecimento do sulfentrazone. Como nesses dois solos (oxídicos e argilosos) a possibilidade de adsorção do sulfentrazone na superfície (por interação dipolo-dipolo, ou adsorção iônica) é muito maior que no caulínítico, levando ainda em conta que o extrator usado (metanol), talvez não consiga deslocar sulfentrazone iônico adsorvido, pode-se pensar que ele estava sorvido ao solo, mas não foi detectado. Essa suspeita é corroborada pela intoxicação do milho nesses solos (Figura 5) que ocorreu em praticamente todas as profundidades, o que significa que o sulfentrazone estava presente, nos solos oxídicos, no tratamento testemunha. Isso demonstra uma “superioridade” do bioensaio frente à cromatografia e leva à necessidade de se desenvolver extratores mais eficientes para o herbicida adsorvido ao solo.

Para os tratamentos com as plantas remediadoras, o resultado da análise cromatográfica evidenciou que praticamente todo o sulfentrazone se concentrou na primeira camada do solo hematítico, no tratamento com crotalária (Tabela 3). Poder-se-ia perguntar: mas porque o metanol conseguiu extrair nesse caso? A resposta se deve às possíveis interações do sistema radicular das plantas remediadoras com o solo (alterando o pH, por exemplo) e com o sulfentrazone, o que pode tê-lo deixado mais livre da influência do solo, quando comparado com o tratamento testemunha, tanto para ser extraído pelo metanol, como para ser absorvido pela planta bioindicadora. Os resultados da Figura 5 também corroboram esta hipótese, quando é observado que nos tratamentos com crotalária (em todas as profundidades, no solo hematítico) e no tratamento com feijão de porco, nas maiores profundidades, no solo

gibbsítico, a intoxicação do milho foi maior nos tratamentos submetidos à fitorremediação, do que na testemunha. Os resultados da cromatografia são, portanto, muito coerentes com os do bioensaio.

Uma vez que as análises cromatográficas de sulfentrazone no material vegetal não evidenciaram a presença do herbicida, não é possível fechar o balanço de massa, quanto à distribuição do mesmo entre solo, lixiviado e partes das plantas remediadoras. Pode ser que as quantidades absorvidas tenham sido muito pequenas, ou que a molécula do herbicida tenha sofrido alguma degradação na planta.

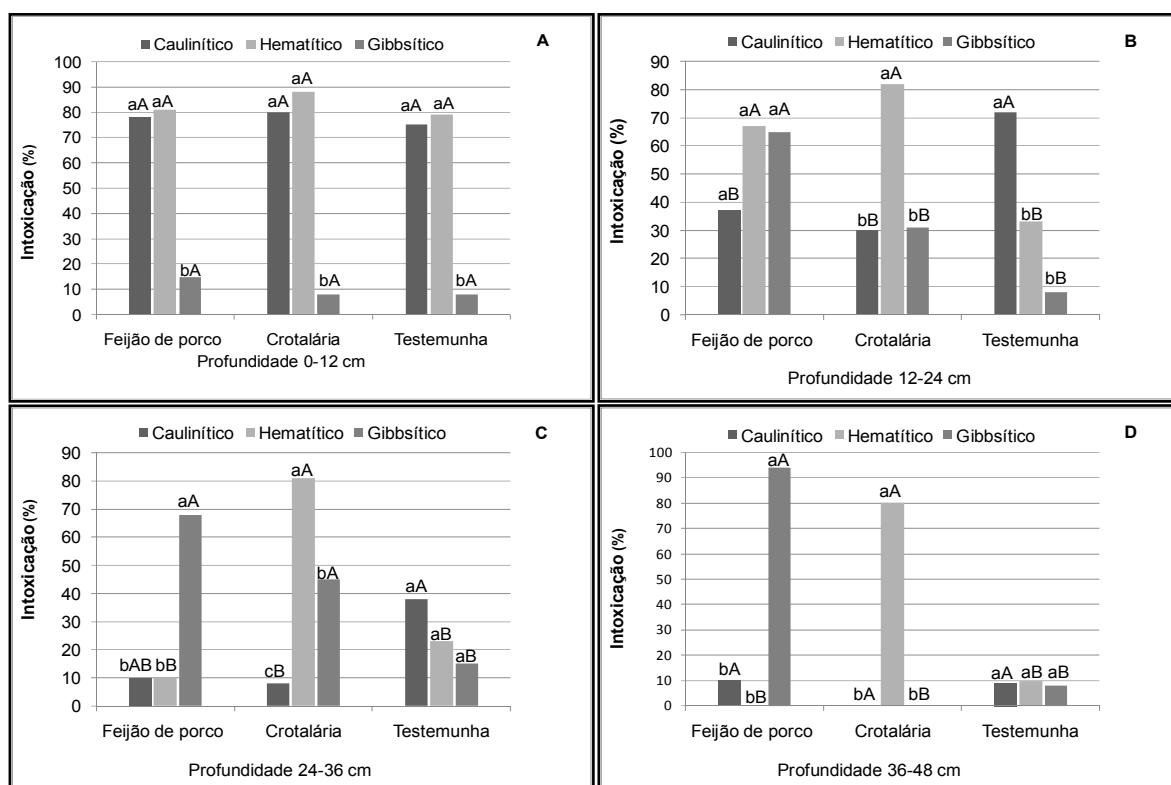


FIGURA 5. Fitotoxidade(%) de *Pennisetum glaucum* cultivadas em solos tratados com dose de 400g ha⁻¹ de sulfentrazone com pré-cultivo de duas espécies remediadoras e uma testemunha (sem planta), em quatro profundidades, aos 30 dias após a semeadura (DAS).

Letras minúsculas comparam os solos e maiúsculas comparam as plantas. Médias representadas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Independentemente das características físicas e químicas dos solos, observa-se que todos os tratamentos apresentaram algum grau de fitotoxidade até a profundidade 24-36 cm (Figura 5).

O processo de lixiviação de compostos químicos é influenciado pela capacidade de sorção desses aos colóides dos solos, das características físico-químicas do composto e das características de solo e clima (INOUE et al., 2003). A menor sorção do sulfentrazone resulta em maior mobilidade do herbicida e presença deste em camadas subsuperficiais.

A lixiviação apresenta dois aspectos importantes: é fundamental para a incorporação superficial da maioria dos herbicidas, atingindo sementes ou plantas em germinação, mas, quando excessiva, pode carregá-los para camadas mais profundas, limitando sua ação e podendo, inclusive, promover contaminação do lençol freático (VELINI, 1992).

Quando se analisa a lixiviação do herbicida nos solos (Tabela 4), percebe-se que a mobilidade do herbicida foi maior no solo caulínítico, em seguida no solo gibbsítico, e por último no solo hematítico, sendo maior para a testemunha (sem cultivo), seguida do pré-cultivo pela crotalária e por último para o pré-cultivo do feijão de porco. No solo hematítico foi detectado resíduo do herbicida somente no pré-cultivo do feijão de porco. A explicação pode estar no exposto acima sobre as interações possíveis do sistema radicular das plantas remediadoras com o solo, quando já se observou que nas maiores profundidades, a intoxicação do milho foi maior nos tratamentos submetidos à fitorremediação do que na testemunha.

Observando a figura 5, percebe-se, na profundidade 36-48 cm, que este solo, hematítico, no pré-cultivo do feijão de porco, não apresentou intoxicação. Com o pré-cultivo da crotalária apresentou 80% de intoxicação e na testemunha (sem cultivo) percentual de 10% de intoxicação à bioindicadora. Estas informações concordam com os dados da análise cromatográfica desse solo apresentados na Tabela 3, demonstrando que o produto não foi encontrado.

Os resultados desse trabalho estão de acordo com os encontrados por Ferraço et al. (2017), ao concluírem que os ensaios biológicos podem traduzir melhor o comportamento agrônomo esperado, mais do que a cromatografia, em sucessões envolvendo a fitorremediação, especialmente quando se trata de princípios ativos aplicados em doses muito baixas no solo, abaixo do limite de detecção dos cromatógrafos, mas ainda com atividade herbicida no solo.

Oliveira et al. (2014), avaliando o método analítico de cromatografia líquida para a determinação de resíduos do sulfentrazone em solos em comparação com o método de bioensaio utilizando o *P. glaucum* como bioindicador, concluíram que em

doses muito baixas de sulfentrazone no solo, nem sempre é possível detectar e quantificar o princípio ativo pela cromatografia. O bioindicador *P. glaucum* mostrou uma sensibilidade mais elevada do que a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência / UV-DAD ao sulfentrazone, mesmo em níveis mais baixos do que os detectados pela análise cromatográfica.

Com base nos resultados desse trabalho, pode-se sugerir algumas conclusões:

1) o herbicida pode ter ficado adsorvido ao solo; 2) o herbicida pode ter sido rizodegradado; 3) o herbicida pode ter sido fitoextraído e, ou, o princípio ativo estava abaixo do limite de detecção do cromatógrafo.

Sugere-se, quanto à fitorremediação do herbicida, comparando-se os três tratamentos, que o pré-cultivo pela crotalária e feijão de porco, no solo gibbsítico, tiveram desempenho melhor se comparados à testemunha com o mesmo solo (Figura 5-D).

Observando a lixiviação ao longo das colunas, nota-se que enquanto os solos caulínítico e hematítico apresentaram valores de fitotoxidade maiores na profundidade 0-12 cm (Figura 5-A) e foram diminuindo à medida que a profundidade aumentava, o solo gibbsítico apresentou comportamento inverso até a profundidade 24-36 cm (Figura 5-C). No entanto, na profundidade 36-48 cm, para este tratamento com pré-cultivo da crotalária, a fitotoxidade não foi verificada (Figura 5).

Grey et al. (1997), afirmaram que a adsorção e mobilidade do sulfentrazone são dependentes do tipo e do pH do solo, sendo que a sorção decresce e a mobilidade aumenta quando o pH está acima do pK_a do herbicida. Isto acontece em solos com carga permanentemente negativa, como os solos temperados. Em solos oxídicos, o desenvolvimento de carga negativa no sulfentrazone pode propiciar sua adsorção catiônica nas cargas positivas dos óxidos de ferro e alumínio, cujo ponto de carga zero usualmente se encontra em pH acima de 7,5 ou mais. Como o sulfentrazone é um ácido fraco, apresenta características de compostos aniônicos, sofrendo ionização em solução aquosa, em função do seu pK_a e do índice de pH do meio. Considerando-se o pK_a do sulfentrazone igual a 6,56 (RODRIGUES & ALMEIDA, 2005), e os valores de pH dos solos utilizados (Tabela 1), apenas no solo caulínítico o pH estaria próximo ao pK_a . Isso aumenta a chance de uma maior mobilidade no solo caulínítico (eletro negativo) e uma maior adsorção nos solos oxídicos (eletro positivos).

Por outro lado, o herbicida ainda pode sofrer sorção importante pela matéria orgânica. Este tipo de interação, contudo, além da influência do pH, depende da natureza da matéria orgânica e da interação desta com a parte mineral do solo. É uma avaliação complexa e não se pode, muitas vezes, fazer uma previsão de comportamento com base apenas no teor de carbono do solo. Contudo, no caso dos herbicidas que têm apresentado elevada capacidade adsorptiva no solo, em especial para os mais hidrófobos, o conteúdo de matéria orgânica do solo é geralmente um fator importante, e tem mostrado correlação positiva com a adsorção do herbicida e, com a menor a lixiviação do mesmo. Pelos resultados obtidos, verifica-se que outros fatores podem ter influenciado na disponibilidade do produto na solução do solo.

Quanto à altura da planta bioindicadora, na profundidade 0-12 cm, verifica-se que houve diferença significativa com o pré-cultivo do feijão de porco apenas para o solo gibbsítico. Com o pré-cultivo pela crotalária houve diferença significativa entre os três solos, observando-se altura maior da planta no solo gibbsítico, seguido pelo caulínítico. Nota-se que nesse pré-cultivo, para o solo hematítico, a bioindicadora apresentou altura quase 50% menor se comparado com o pré-cultivo pelo feijão de porco, porém, não diferiu estaticamente da testemunha. Comparando esses dados com as Figuras 5-A e 7-A, percebe-se que este solo apresentou maior percentual de fitotoxicidade e menor acúmulo de massa seca da parte aérea da bioindicadora, com o pré-cultivo da crotalária.

Ao analisar o acúmulo de MSPA para mesma profundidade (0-12 cm), no solo pré-cultivado com o feijão de porco, observa-se que não houve diferença entre os três solos (Figura 7-A). Porém, com o pré-cultivo da crotalária, o solo gibbsítico foi significativo, apresentando maior valor de MSPA. Este maior acúmulo de MSPA seca apresentado pela bioindicadora em cultivo no solo gibbsítico, provavelmente ocorreu pela retenção do herbicida que foi maior nesse, possivelmente, devido ao maior percentual de matéria orgânica. No entanto, percebe-se, para o solo gibbsítico, com pré-cultivo da crotalária, que em valores absolutos, o acúmulo de MSPA da bioindicadora foi maior em todas as profundidades (Figura 7), com diferença significativa apenas na profundidade 24-36 cm, quando também as plantas apresentaram maior altura, sendo significativa para a crotalária nas profundidades 12-24 cm e 24-36 cm (Figura 6-B e C)

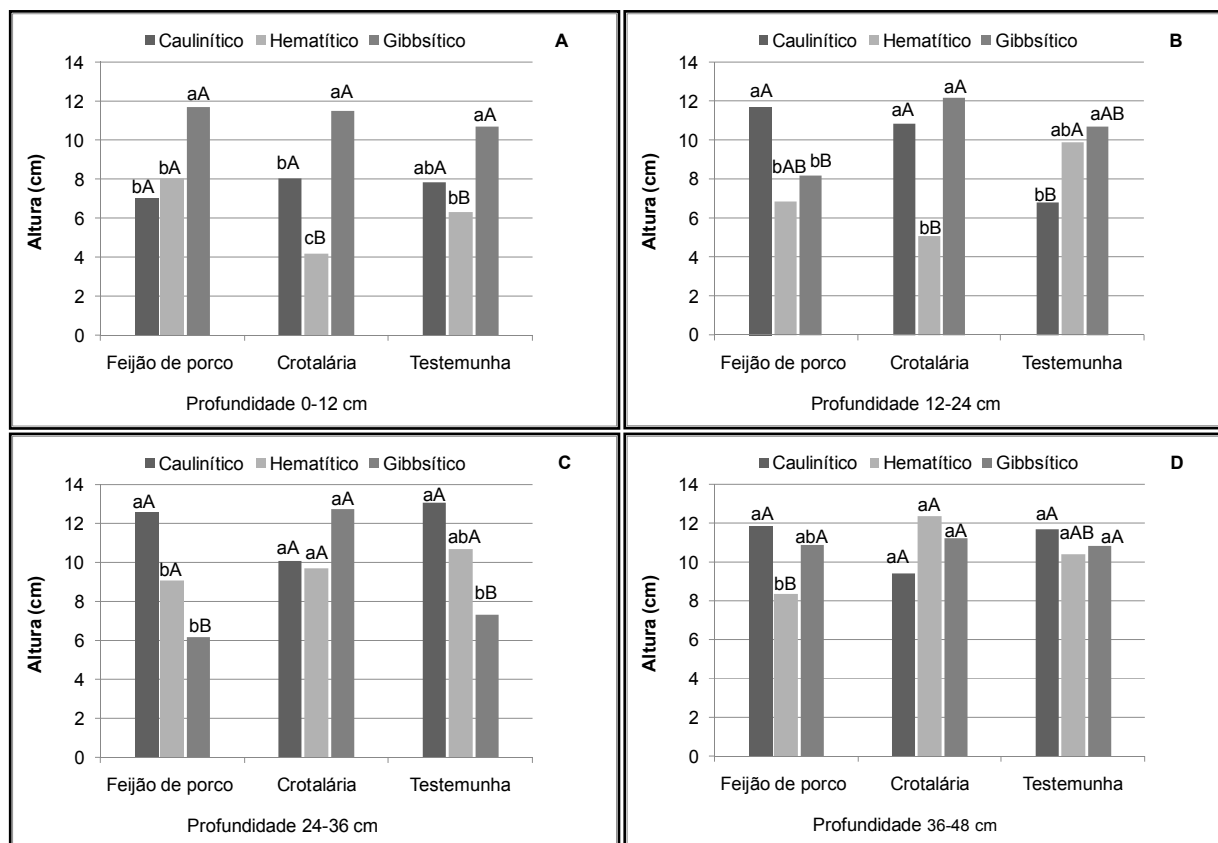


FIGURA 6. Altura (cm) de *Pennisetum glaucum* cultivadas em solos tratados com dose de 400g ha⁻¹ de sulfentrazone com pré-cultivo de duas espécies remediadoras e uma testemunha (sem planta), em quatro profundidades, aos 30 dias após a semeadura (DAS).

Letras minúsculas comparam os solos e maiúsculas comparam as plantas. Médias representadas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

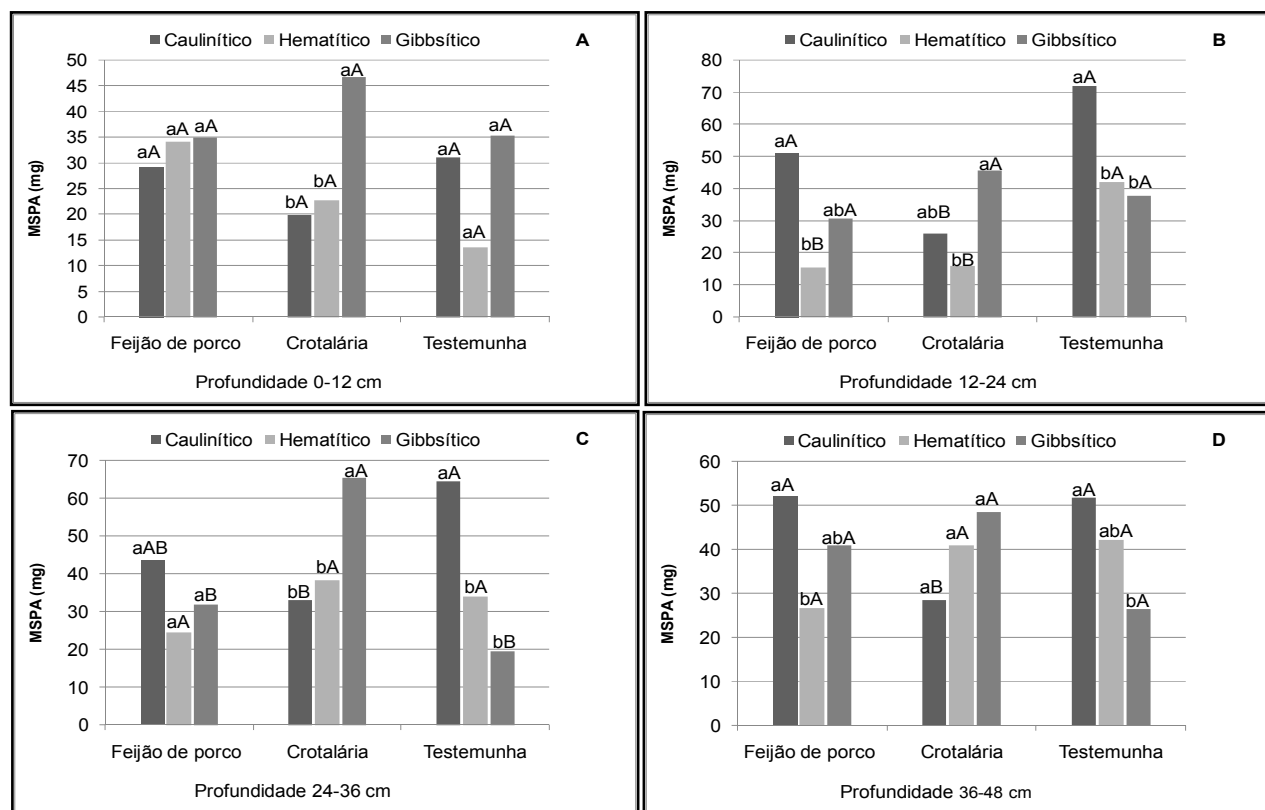


FIGURA 7. Massa seca da parte aérea (MSPA, mg) de *Pennisetum glaucum* cultivadas em solos tratados com dose de 400g ha^{-1} de sulfentrazone com pré-cultivo de duas espécies remediadoras e uma testemunha(sem planta), em quatro profundidades, aos 30 dias após a semeadura (DAS).

Letras minúsculas comparam os solos e maiúsculas comparam as plantas. Médias representadas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Apesar desses resultados, nota-se que na profundidade 24-36 cm, com o pré-cultivo da crotalária no solo gibbsítico, foi o limite para que o herbicida estivesse disponível e também houve o maior percentual de intoxicação (45%) deste pré-cultivo (Figura 5-C). Com base nisso e comparando com a testemunha (Figura 5-D), observa-se que somente a testemunha apresentou intoxicação na última profundidade no solo gibbsítico. Possivelmente os pré-cultivos influenciaram a retenção ou movimentação do herbicida, favorecendo maior altura e MSPA da planta bioindicadora. No entanto, quando se compara o mesmo solo com pré-cultivo do

feijão de porco com o solo gibbsítico com o pré-cultivo da crotalária, observa-se tendência, em todas as profundidades, que o pré-cultivo da crotalária favoreça menor percentual de intoxicação, maior altura e maior MSPA da planta bioindicadora.

Esses resultados estão corroborando com o trabalho de Madalão et al. (2012), que em estudo sobre uso de leguminosas na fitorremediação de solo contaminado com sulfentrazone, encontraram menor redução na altura e biomassa fresca e seca quando *P. glaucum* foi antecedido pela *Crotalária juncea*.

Werlang (2005), pesquisando sobre sorção do sulfentrazone pelos constituintes da fração argila, concluiu que a sorção acontece na seguinte ordem decrescente: ácidos húmicos > hematita > gibbsita > caulinita.

No presente estudo, com base nos resultados das Tabelas 3 e 4, corroborados pelos resultados da Figura 5, a maior retenção foi observada no solo hematítico, seguido do gibbsítico, ficando o solo caulínítico por último. Observa-se, que o teor de matéria orgânica (Tabela 1) não foi um fator determinante na ordem de retenção. O solo caulínítico que tem praticamente o dobro da M.O. do solo hematítico, foi o que apresentou as menores retenções, e o solo hematítico, que é o mais pobre em M.O. foi o mais eficiente na redução da mobilidade do sulfentrazone. Deve-se ressaltar que a presença e natureza da planta fitorremediadora, altera completamente o perfil de lixiviação, quando comparado com o tratamento testemunha, nos três solos estudados.

Procópio et al. (2001), em pesquisa sobre sorção do herbicida atrazine em complexos organominerais, descreveram que solos com predominância de caulinita e óxidos de ferro e alumínio na fração argila e baixos teores de matéria orgânica são mais propensos à lixiviação de herbicidas e conseqüentemente contaminação de águas subterrâneas. A maior intoxicação pode estar relacionada à menor sorção.

No caso do solo caulínítico, estudado no presente trabalho, que apresentou o segundo teor mais elevado de M.O. poderia ter tido uma retenção ainda menor na ausência dessa matéria orgânica.

Quanto maior a superfície específica de uma fração mineral, maior sua contribuição para capacidade sortiva do solo, com isso a retenção de nutrientes, moléculas orgânicas e água, é associada ao conteúdo de argila do solo (CHRISTOFFOLETTI & LOPEZ OVEJERO, 2009). Segundo Fernandes Filho et al. (2001), a superfície específica dos minerais caulinita, hematita e gibbsita são, respectivamente: 10-30, 300-500 e 2-5 m² g⁻¹. Correlacionando essas informações

com o presente trabalho, nota-se, na profundidade superficial, que houve menor lixiviação do herbicida no solo com predomínio do mineral hematita, seguido da gibbsita. Contudo o resultado final é uma soma da contribuição de vários fatores e a própria superfície específica, no caso dos solos estudados é mais influenciada pela textura dos solos, do que pela natureza dos colóides da fração argila, dada a diferença de texturas.

A sorção de alguns herbicidas no solo é importante para promover o controle de plantas daninhas ao longo do tempo pela liberação gradual do produto, reduzindo também a lixiviação. A capacidade de sorção de um solo é que determina, na maioria das vezes, a eficácia do herbicida (HARPER, 1994). Em solos arenosos, a lixiviação, normalmente é maior do que em solos siltosos ou argilosos (ROSSI et al., 2005).

Rizzi (2003), estudando a sorção de sulfentrazone em função da textura, matéria orgânica e umidade de solos, encontrou maior sorção de sulfentrazone em solos com maiores teores de óxidos de ferro e matéria orgânica. Concluiu, contudo, que a sorção foi diferenciada prioritariamente pela: textura (menor na arenosa), teor de matéria orgânica (maior na camada de 0-0,2 m) e pelo nível de umidade do solo (maior no solo seco), não entrando a mineralogia como fator determinante.

Faustino et al. (2015), em estudo sobre mobilidade do sulfentrazone em solos com diferentes características físicas e químicas, concluíram que a movimentação desse herbicida nos solos é altamente influenciada por suas características químicas e físicas, principalmente o teor de argila e a matéria orgânica, concordando com os resultados semelhantes aos encontrados no presente trabalho.

Madalão et al. (2012), em estudos sobre uso de leguminosas na fitorremediação de solo contaminado com sulfentrazone, concluíram que *C. juncea* foi a espécie que apresentou a maior capacidade de fitorremediar solos contaminados com herbicida sulfentrazone até a dose de 400 g i.a. ha⁻¹. Os resultados do presente trabalho (Tabelas 3 e 4) mostram que o feijão de porco no solo gibbsítico foi o mais eficiente, reduzindo em 28% a carga de sulfentrazone aplicada. No solo caulínítico, o feijão de porco reduziu a massa total de sulfentrazone em aproximadamente 11% e a crotalária em 19%.

Apenas o solo caulínítico com o pré-cultivo da crotalária apresentou intoxicação menor que a testemunha (sem pré-cultivo) nas profundidades 12-24 cm e 24-36 cm sem diferir estatisticamente do pré-cultivo com o feijão de porco. Os outros dois solos apresentaram percentuais de intoxicação maiores ou iguais às

testemunhas. Uma possível explicação para esta diferença talvez esteja na textura dos solos. O solo caulínítico é de textura média e consequentemente o herbicida estava mais disponível desde a superfície, havendo mais tempo de contato com as raízes das remediadoras e uma possível degradação pode ter sido acelerada. Nos outros solos com alto teor de argila uma possível degradação pode ter sido mais lenta. No entanto, a provável explicação para a menor intoxicação na testemunha é que, como neste não houve pré-cultivo e, consequentemente, ocorreu menor consumo de água, esta saturou os solos e facilitou a percolação do herbicida cujo resultado demonstrou menor percentual de intoxicação na planta bioindicadora. OHMES et al. (2000), descreveram que a dissipação do sulfentrazone está diretamente relacionada com a disponibilidade de água, podendo melhorar as condições de degradação da molécula ou mesmo lixiviá-la em profundidade no solo.

Esse fato pode ser confirmado porque o tratamento caulínítico da testemunha apresentou diferença significativa se comparada com os dois pré-cultivos nas profundidades 12-24 cm e 24-36 cm (Figura 5).

Conclusões

- A movimentação do herbicida foi maior no solo caulínítico, independentemente dos pré-cultivos.
- A retenção do herbicida foi maior no solo hematítico, independentemente dos pré-cultivos.
- A fitorremediação foi mais eficiente quando houve pré-cultivo do feijão de porco em solo gibbsítico, reduzindo em 28% a carga de sulfentrazone aplicada,
- No pré-cultivo da crotalária no solo caulínítico, reduzindo a massa total de sulfentrazone em 19%.
- Não foi possível verificar resultados para o solo hematítico para nenhum pré-cultivo, sugerindo que em um solo com predomínio do mineral hematita e alto índice de argila, a fitorremediação fica prejudicada.

Referências

ALAM (Asociación Latinoamericana de Malezas). Resumen del panel de métodos de evaluación de control de malezas en Latinoamérica. **Revista de la Asociación Latinoamericana de Malezas**. p.6-38,1974.

AMABILE, R.F.; FANCELLI, A.L.; CARVALHO, A.M. Comportamento de espécies de adubos verdes em diferentes épocas de semeadura e espaçamentos na região dos Cerrados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.1, p.47-54, 2000.

BARBOSA, W. L. R. et al. **Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais**. (Edição Revisada). Universidade Federal do Pará, 2001. 19p.

BENEVENUTO, J.G.F. Efeitos de componentes mineralógicos e orgânicos de alguns latossolos na Adsorção de Herbicida Fluometuron. Viçosa-MG. 94p. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Viçosa, 1983

BLANCO, F.M.G.; VELINI, E.D.; BATISTA FILHO, A. Persistência do herbicida sulfentrazone em solo cultivado com cana-de-açúcar. **Revista Bragantia**, v.69, n.1, p.71-75, 2010.

BLANCO, F.M.G.; VELINI, E.D. Persistência do herbicida sulfentrazone em solo cultivado com soja e seu efeito em culturas sucedâneas. **Revista Planta Daninha**, v.23, n.4, p.693-700, 2005.

CARVALHO, A.M. et al. **Manejo de adubos verdes no Cerrado**. Embrapa Cerrados, 1999. 28p. (Circular Técnica, 4).

CHRISTOFFOLETI, P. J; OVEJERO, R. F. L. **Comportamento dos Herbicidas aplicados ao solo na cultura da cana-de-açúcar**. Piracicaba-SP, 2009. 72p.

CHRISTOFFOLETI, P. J.; LOPEZ OVEJERO, R. F. **Dinâmica dos herbicidas aplicados ao solo na cultura da cana-de-açúcar**. Piracicaba-SP, 2005. 49p.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, Safra 2016/17-Segundo levantamento. Brasília-DF, 2016.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, Safra 2013/2014 - Quarto Levantamento. Brasília-DF, 2014.

CUNNINGHAM, S. D.; ANDERSON, T. A.; SCHWAB, A. P. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. **Advances in Agronomy**, v.56, n.1, p.55-114, 1996.

DAMIN, V. Biodegradação, sorção e dessorção do herbicida 14C-Diuron em dois Latossolos tratados com lodo de esgoto. 71p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, 2005.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos (Rio de Janeiro, RJ). Manual de métodos de análise de solo. 2.ed. rev. atual. Rio de Janeiro-RJ, 1997. 212p. (EMBRAPA-CNPS. Documentos, 1).

FAUSTINO, L.A. et al. Mobilidade do sulfentrazone em solos com diferentes características físicas e químicas. *Revista Planta Daninha*, v.33, n.4, p.795-802, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582015000400018> Acesso em: 08 de jun. de 2016

FERNANDES, B.; SYKES, I.O. Capacidade de campo e retenção de água em três solos de Minas Gerais. *Revista Ceres*, v.15, n.1, p.1-39, 1968.

FERNANDES FILHO, I.E.; FRANCELINO, M.R.; **Solo como sistema trifásico**. Viçosa-MG, 2001 – Apostila de Física do Solo. 41p.

FERRAÇO, M. et al. Efeito da densidade populacional de *Canavalia ensiformis* na fitorremediação de solo contaminado com sulfentrazone. *Revista Ciência Agronômica*, v.48, n.1, p.32-40, 2017

FERREIRA, Daniel Furtado. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciência Agrotecnica*. [online]. 2014, vol.38, n.2 [citado 2015-10-17], p. 109-112. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001>. Acesso em: 08 set. 2016

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). 2050: A escassez de água em várias partes do mundo ameaça a segurança alimentar e os meios de subsistência. Roma, 2016. Disponível em: <https://www.fao.org.br/2050eavpmasams.asp>. Acesso em: 08 set. 2016.

FOLEY, Jonathan A. et al. Solutions for a cultivated planet. *Nature*, v.478, n.7369, p.337-342, 2011.

FREITAS, M.A.M. et al. Sulfentrazone sorption in different types of soil by bioassays. *Revista Planta Daninha*, v.32, n.2, p.385-392, 2014.

GREY, T. L. et al. Sulfentrazone adsorption and mobility as affected by soil and pH. *Weed Science*, v.45, n.5, p.733-738, 1997.

GREEN, R. E. Pesticide-clay-water interactions. In: GUELZI, W. D. (Ed.) **Pesticides in soil and water**. Madison: SSSA, 1974. p.3-37.

HARPER, S.S. Sorption-desorption and herbicide behavior in soil. In : DUKE, S.O. (Ed.) **Reviews of weed science**. Champaign: Weed Science Society of America, 1994. v.6, p.207-225.

IEA - INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA - IEA. **Defensivos Agrícolas: comercialização recorde em 2013 e expectativas de crescimento nas vendas em 2014.** São Paulo: IEA, 2014. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br/out/LerTexto.php?codTexto=13467>. Acesso em: 08 set. 2016.

INOUE, M. H. et al. Critérios para avaliação do potencial de lixiviação dos herbicidas comercializados no Estado do Paraná. **Revista Planta Daninha**, v.21, n.2, p.313-323, 2003.

KLINGMAN, G.C. et al. **Weed Science: principles and practices.** New York: John Wiley, 1975. 431p.

LOURENÇATO, L. F. **Potencial de contaminação de águas superficiais por agrotóxicos na microbacia hidrográfica do Campestre.** 48p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Área de Concentração em Pedologia e Manejo do Solo, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2010.

LOUX, M. M.; LIEBL, R. A.; SLIFE, F. W. Adsorption of imazaquin and imazethapyr on soils, sediments, and selected adsorbents. **Weed Science**, v.37, n.3, p.712-718, 1989.

MADALÃO, J. C. **Fitorremediação do sulfentrazone em argissolo vermelho-amarelo e sua sorção e dessorção em diferentes tipos de solos.** 46p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2014.

MADALÃO, J. C. et al. Uso de leguminosas na fitorremediação de solo contaminado com sulfentrazone. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.42, n.4, p.390-396, 2012.

MADALÃO, J.C. et al. O herbicida sulfentrazone interfere na biomassa microbiana e na atividade da microbiota do solo. **Revista Ciências Agrárias**, v.59, n.1, p.54-59, 2016.

MANCUSO, M. A. C.; NEGRISOLI, E.; PERIM, L. Efeito residual de herbicidas no solo ("Carryover"). **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.10, n.2, p.151-164, 2011.

MARTINEZ, C. O. Biotransformação do herbicida sulfentrazone em solos brasileiros. 93p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2006.

McBRIDE, M.B. **Environmental chemistry of soils.** New York, Oxford University Press, 1994. 406p.

MEHRA, O.P.; JACKSON, M.L. **Iron oxide removal from soils and clays by a dithionite-citrate system buffered with sodium bicarbonate.** In: CLAYS & CLAY MINERAL CONFERENCE, 7. London. Proceedings. v.7, p.317-327, 1960.

MENEZES, C. T. **Método para priorização de ações de vigilância da presença de agrotóxicos em águas superficiais: um estudo em Minas Gerais**. 117p. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) - Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, 2006.

MONQUERO, P. A.; SILVA, P. V.; SILVA HIRATA, A. C.; TABLAS, D. C.; ORZARI, I. Lixiviação e persistência dos herbicidas Sulfentrazone e Imazapic. **Revista Planta Daninha**, v.28, n.1, p.185-195, 2010.

MUSUMECI, M. R. Defensivos agrícolas e sua interação com a microbiota do solo. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. (Coord.). **Microbiologia do solo**. Campinas-SP: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p.341-360.

OLIVEIRA, M.A.; PIRES, F.R.; FERRAÇO, M.; BELO, A.F. The validation of an analytical method for sulfentrazone residue determination in soil using liquid chromatography and a comparison of chromatographic sensitivity to millet as a bioindicator species. **Journal Molecules**, v.19, n.8, p.10982-10997, 2014.

OLIVEIRA, M. F.; BRIGHENTI, A. M. Comportamento dos herbicidas no ambiente. In: OLIVEIRA JÚNIOR, R. S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M. H. **Biologia e manejo de plantas daninhas**. Curitiba-PR: Omnipax, 2011. p.263-304.

OLIVEIRA JÚNIOR, R. S.; REGITANO, J. B. Dinâmica de pesticidas no solo. In: MELO V. F.; ALLEONI, L. R. F. (Ed.). **Química e mineralogia do solo: parte II, aplicações**. Viçosa- MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2009. p.187-248.

OLIVEIRA, M. F. Comportamento de herbicidas no ambiente. In: OLIVEIRA JUNIOR, R. S.; CONSTANTIN, J. (Coord.). **Plantas daninhas e seu manejo**. Guaíba-RS: Agropecuária, 2001. p.315-362.

OHMES, G.A.; MUELLER, T.C. Sulfentrazone Adsorption and Mobility in Surface Soil of the Southern United States. **Weed Technology**, v.21, n.3, p.796-800, 2007.

OHMES, G. A.; HAYES, R. M.; MUELLER, T. C. Sulfentrazone dissipation in a Tennessee soil. **Weed Technology**, v.14, n.1, p.100-105, 2000.

PRATA, F.; LAVORENTI, A. Comportamento de herbicidas no solo: Influência da matéria orgânica. **Revista Biociências**, v.6, n.2, p.17-22, 2000.

PIRES, F. R.; EGREJA FILHO, F. B.; PROCÓPIO, S. O. **Inferências sobre mineralogia dos solos, sorção e fitorremediação de herbicidas**. In: FERREIRA, A.; LIMA, A. B. P.; MATTA, F. P.; AMARAL, J. A. T.; LOPES, J. C.; PEZZOPANE, J. E. M.; FERREIRA, M. F. S.; POLANCZYK, R. A.; SOARES, T. C. B. (Ed.). **Tópicos Especiais em Produção Vegetal I**. 1. ed. Vitória-ES: EDUFES, 2009. p.391-406.

PIRES, F. R.; SOUZA, C. M.; SILVA, A. A.; PROCÓPIO, S. O.; FERREIRA, L. R. Fitorremediação de solos contaminados por herbicidas. **Revista Planta Daninha**, v.21, n.2, p.335-341, 2003.

PREZOTTI, L. C.; GOMES, J. A.; DADALTO, G. G.; OLIVEIRA, J. A. **Manual de Recomendação de Calagem e Adubação para o Estado do Espírito Santo – 5ª aproximação**. Vitória-ES: SEEA/INCAPER/ CEDAGRO, 2007. 305p.

PROCÓPIO, S. O. et al. Sorção do herbicida atrazine em complexos organominerais. **Revista Planta Daninha**, v.19, n.3, p.391-400, 2001.

RIZZI, F.R. **Sorção de sulfentrazone em função da textura, matéria orgânica e umidade de solos**. 83p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp - Campus de Botucatu, 2003.

ROCHA, W. S. D. **Sorção de imazaquin em Latossolos ácricos**. 59p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Solos e nutrição de plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba-SP, 1999.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**. 5.ed. Londrina-PR: Edição dos autores, 2005. p.484-490.

ROSSI, C.V.S., ALVES, P.L.C.A. MARQUES JÚNIOR, J. Mobilidade do sulfentrazone em latossolo vermelho e em chernossolo. **Revista Planta Daninha**, v.23, n.4, p. 701-710, 2005.

SANTOS, E. A. et al. Fitoestimulação por *Stizolobium aterrimum* como processo de remediação de solo contaminado com trifloxysulfuron-sodium. **Revista Planta Daninha**, v. 25, n.2, p. 259-265, 2007.

SANTOS, J. B. et al; JAKELAITIS, A.; SILVA, A. A.; VIVIAN, R.; COSTA, M. D.; SILVA, A. F. Atividade microbiana do solo após aplicação de herbicidas em sistemas de plantio direto e convencional. **Revista Planta Daninha**, v.23, n.4, p.683-691, 2005.

SERAFIM, C.; NART, V.; MALHEIROS, A.; CRUZ, A. B.; MONACHE, F. D.; GETTE, M. A.; ZACCHINO, S.; FILHO, V. C. Avaliação do potencial antimicrobiano de *Plinia glomerata* (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.4, p.578-582, 2007.

SILVA, F. A. **Degradação do pesticida diurom e do metabólito sulfato de endossulfam em Latossolo e avaliação da lixiviação do diurom usando modelagem matemática e simulação**. 144p. Dissertação (Mestrado em Recursos Hídricos) – Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá-MT, 2009.

SILVA FILHO, C. F. **Determinação de resíduos dos pesticidas pirimetanil, pirimicarbe e buprofezina em águas ambientais por SPME e GC-MS**. 101p. Dissertação (Mestrado em Química) – Núcleo de pós-graduação em Química, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão-SE, 2009.

TUFFI SANTOS, L. D.; FERREIRA, F. A.; MEIRA, R. M. S. A.; BARROS, N. F.; FERREIRA, L. R.; MACHADO, A. F. L.. Crescimento e morfoanatomia foliar de eucalipto sob efeito de deriva do glyphosate. **Revista Planta Daninha**, v.23, n.1, p.133-142, 2005.

VELINI, E. D. Comportamento de herbicidas no solo. In: SIMPÓSIO: MANEJO INTEGRADO DE PLANTAS DANINHAS EM HORTALIÇAS, 1992, Botucatu-SP. Anais...Botucatu: FCA – UNESP, 1992. p.44-64.

VIVIAN, R.; REIS, M. R.; JAKELAITIS, A.; SILVA, A. F.; GUIMARÃES, A. A.; SANTOS, J. B.; SILVA, A. A. Persistência de sulfentrazone em Latossolo vermelho-amarelo cultivado com cana-de-açúcar. **Revista Planta Daninha**, v.24, n.4, p.741-750, 2006.

WEBER, J.B.; WILKERSON, G. G.; REINHARDT, C. F. Calculating pesticide sorption coefficients (Kd) using selected soil properties. **Chemosphere**, v.55, n.2, p.157-166, 2004.

WEBER, J. B.; SCOTT, D. C. Availability of a cationic herbicide adsorbed on clay minerals to cucumber seedling. **Science**, v.152, n.3727, p.1400-1402, 1966.

WERLANG, R. C. **Atividade do sulfentrazone em solos sob plantio direto e convencional**. 100p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa-MG, 2005.

1.2 ATRIBUTOS DA MICROBIOTA ASSOCIADA À RIZOSFERA DE *Canavalia ensiformis* E *Crotalaria juncea* NA FITORREMEDIAÇÃO DO HERBICIDA SULFENTRAZONE

Resumo

Diante dos impactos ambientais ocasionados pelo uso de herbicidas nas práticas agrícolas torna-se prioritário estudar o papel da microbiota do solo na fitorremediação. Portanto, objetivou-se avaliar a contribuição microbiana rizosférica das espécies *C. ensiformis* e *C. juncea* na fitorremediação do sulfentrazone. Os tratamentos foram compostos pela combinação entre dois tipos de solo (rizosférico e não-rizosférico) e quatro níveis de contaminação pelo herbicida sulfentrazone (0, 200, 400 e 800 g ha⁻¹), dispostos em esquema fatorial 3 x 4 em DIC. Foram avaliados a evolução de CO₂, carbono da biomassa microbiana (CBM), quociente metabólico (qCO_2), componentes biométricos, fitotoxidade do *P. glaucum*, em bioensaio, cromatografia líquida do solo e realizado o perfil genético microbiano. Os resultados demonstraram que o cultivo das espécies fitorremediadoras promoveu incremento da atividade microbiana, havendo maior atividade rizosférica da microbiota associada à espécie *C. ensiformis*. A microbiota associada às duas espécies mostraram potencial para descontaminação de solos com resíduo do herbicida sulfentrazone principalmente na dose de 200 g ha⁻¹ e foi verificado que os perfis bacterianos foram formados de acordo com a planta e a característica de solo (rizosférico e não rizosférico), ampliando os conhecimentos a respeito das associações entre as plantas e microrganismos.

Palavras-chave: Biorremediação, Aduvos Verdes, Milheto, fitotoxidade, DNA, Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)

Abstract

In view of the environmental impacts caused by the use of herbicides in agricultural practices, it is a priority to study the role of soil microbiota in phytoremediation. Therefore, the objective was to evaluate the rhizospheric microbial contribution of the species *C. ensiformis* and *C. juncea* in the phytoremediation of sulfentrazone. The treatments were composed by a combination of two types of soil (rhizospheric and non-rhizospheric) and four levels of sulfentrazone (0, 200, 400 and 800 g ha⁻¹), arranged in a 2 x 4 factorial scheme in DIC. The evolution of CO₂, microbial biomass carbon (MBC), metabolic quotient (*q*CO₂), biometric components, *P. glaucum* phytotoxicity, bioassay, soil liquid chromatography and microbial genetic profile were evaluated. The results showed that the cultivation of the phytoremediate species promoted an increase in the microbial activity, with a higher rhizospheric activity of the microbiota associated with the species *C. ensiformis*. The microbiota associated to the two species showed potential for decontamination of soils with sulfentrazone herbicide residues mainly at the dose of 200 g ha⁻¹ and it was verified that the bacterial profiles were formed according to the plant and the soil characteristic (rhizospheric and non-rhizospheric), Increasing the knowledge about the associations between plants and microorganisms.

Key words: Bioremediation, Green Manure, Millet, Phytotoxicity, DNA, Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

Introdução

Atualmente existe uma grande preocupação em torno dos impactos ambientais ocasionados por práticas antrópicas como, por exemplo, a contaminação dos solos causada pelo uso de herbicidas e demais defensivos nas práticas agrícolas. Esses geram resíduos que se acumulam no meio ambiente, tornando-se um problema para o agroecossistema. Existem diversas tentativas de minimizar o efeito desses resíduos para que não fiquem expostos no ambiente (FASANELLA & CARDOSO, 2016).

Sem deixar de considerar outros fatores, a produtividade tem crescido, em grande parte, pela utilização de moléculas xenobióticas (OLIVEIRA & BRIGHENTI, 2011). Um exemplo dessas substâncias são os herbicidas, uma vez que apresentam risco de poluição ambiental devido à sua toxicidade, persistência e bioacumulação (CELIS et al., 2005; SANTOS et al., 2010b).

Alguns desses herbicidas apresentam longo período residual no solo, comportamento considerado importante em situações onde o período total de prevenção da interferência (PTPI) das plantas daninhas sobre as culturas é longo, exercendo assim, controle efetivo durante o período necessário, sem que haja necessidade de sucessivas aplicações, a fim de manter a cultura livre de competição (PROCÓPIO et al., 2009).

A utilização de agroquímicos que apresentem curta persistência no ambiente deveria ser uma estratégia a ser adotada a fim de minimizar esses problemas. Porém, não são todos os produtos que apresentam essa característica, uma vez que nem sempre os compostos disponíveis são seletivos às culturas de interesse, ou apresentem eficácia comprovada ou ainda haja a necessidade de se fazer sucessivas aplicações para que o objetivo seja atingido, evitando assim a mato-competição (SILVA et al., 2007).

O princípio ativo sulfentrazone (N - [2,4-dicloro-5- [4-(difluorometil)- 4,5-dihidro-3 metil -5-oxo- 1H - 1,2,4-triazol -1- il] metanosulfonamida), caracteriza-se como um herbicida pré emergente, atuando no controle de um elevado espectro de plantas daninhas, mono e dicotiledôneas, presente nas culturas da cana-de-açúcar, soja, citros, café e eucalipto (RODRIGUES & ALMEIDA, 2011).

O sulfentrazone pode persistir no solo por um período superior a 539 dias, quando utilizado no controle de plantas daninhas para a cultura da soja (BLANCO &

VELINI, 2005) e até os 704 dias para a cultura da cana-de-açúcar (BLANCO et al., 2010). Além de persistente (MELO et al., 2010; MONQUERO et al., 2010), o sulfentrazone é classificado como móvel e apresenta alto potencial de lixiviação, tanto vertical (para água subterrânea) quanto horizontal (PARAÍBA et al., 2003; MARTINEZ et al., 2008).

Uma das técnicas empregadas como alternativa para contornar e ou, reduzir esses problemas, é a fitorremediação. Apesar de apresentar diferentes definições ela é uma estratégia de biorremediação que consiste em procedimentos que envolvam o emprego de plantas e sua microbiota associada, além de práticas agronômicas que, se aplicadas em conjunto, removem, imobilizam ou tornam os contaminantes inofensivos ou menos tóxicos ao ecossistema (CUNNINGHAM et al., 1996), representando uma alternativa interessante para a agricultura.

Madalão et al. (2012) selecionaram as espécies *C. ensiformis* e *C. juncea* como potenciais fitorremediadoras de sulfentrazone. A importância agronômica dessas espécies é que, além de exibirem tolerância ao herbicida e reduzirem seus níveis no solo, fixam nitrogênio, são de fácil propagação/aquisição e cultivo e não são espécies daninhas (PIRES et al., 2003). Um melhor efeito fitorremediador é obtido com um tempo mínimo de cultivo de 75 dias (MADALÃO et al., 2012) e densidade populacional mínima de 20 plantas de *C. ensiformis* e 120 plantas *C. juncea* por m⁻² (FERRAÇO et al., 2017).

Em bioensaio realizado por Belo et al. (2011) a espécie *Helianthus annuus* destacou-se por apresentar melhor desempenho na diminuição de efeitos de *carryover* do sulfentrazone. Esses resultados mostram a viabilidade ambiental de emprego da fitorremediação para o herbicida sulfentrazone.

Uma das vias responsáveis pela degradação do sulfentrazone é a atividade microbiana (COBUCCI & PORTELA, 2001). Segundo Desai & Desai (1993), fungos e bactérias são agentes transformadores eficazes, haja vista sua habilidade em degradar uma ampla diversidade de substâncias orgânicas, como os herbicidas.

Embora o número de bactérias normalmente seja superior ao de fungos, estes, pela maior massa corpórea, respondem por cerca de 60 a 80% da biomassa microbiana. A biomassa microbiana é essencial nos processos de decomposição de resíduos, atua na estabilização de agregados do solo e na formação da MOS humificada, além de representar fonte lábil de nutrientes às culturas (DICK et al., 2009).

Segundo Melo et al. (2008), a biorremediação caracteriza-se como um conjunto de processos que utilizam organismos (bactérias, fungos, vegetais) para biodegradar, reduzir ou eliminar o risco de compostos orgânicos perigosos ao meio ambiente e à saúde humana, de acordo com os seguintes princípios: disponibilidade do contaminante, microrganismos com capacidade metabólica e condições ambientais que favoreçam a atividade microbiana.

Nos processos de decomposição e mineralização no solo, o destino inicial do carbono (C) proveniente dos resíduos orgânicos é se incorporar à biomassa microbiana, o qual pode passar posteriormente para formas mais estáveis de C no solo, sendo a maior parte perdida para a atmosfera como CO₂ (CARDOSO et al., 2011).

A interação raiz e solo promove a proliferação de comunidades microbianas na região da rizosfera, pela exsudação de nutrientes, aminoácidos e polissacarídeos da planta (ARTHUR et al., 2000). O número de microrganismos é normalmente de 5 a 10 vezes maior em solos anteriormente cultivados do que naqueles sem cultivo prévio, podendo chegar a mais de 100 vezes (ANDERSON et al., 1993). Estudando o emprego do consórcio de microrganismos, a partir de amostras de petróleo, Costa et al. (2007) conseguiram observar a eficiência desse processo na descontaminação de áreas contaminadas.

Martinez et al. (2010), estudando a degradação microbiana do sulfentrazone em Latossolo Vermelho distrófico, isolaram os microrganismos *Nocardia brasiliensis* e *Penicillium sp* como potenciais degradadores de sulfentrazone.

Diante do exposto, percebe-se que a biorremediação revela-se como uma técnica eficiente, promissora e interessante, devido, principalmente, aos baixos custos e por ser uma técnica com mínima intervenção, na maioria das vezes, na recuperação dos ambientes contaminados.

Sendo assim, buscou-se no presente trabalho avaliar a contribuição microbiana rizosférica de *C. ensiformis* e *C. juncea* na fitorremediação do sulfentrazone.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido inicialmente em casa de vegetação e concluído no Laboratório de Fitorremediação, localizados no campus do Centro Universitário Norte do Espírito Santo, da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUNES/UFES), em São Mateus-ES, coordenadas geográficas 18° 43" S; 30° 51" O e altitude de 39 metros e todo trabalho foi realizado no período de janeiro a julho de 2016.

O solo usado no experimento foi coletado na Fazenda Experimental, localizada no CEUNES/UFES, em áreas sem histórico de aplicação de herbicidas, na profundidade de 0-20 cm. As amostras do solo foram caracterizadas quanto à composição química e física (Tabela 1), conforme Embrapa (1997).

TABELA 1: Caracterização química e física do solo utilizado no experimento.

Análise Química						
pH	P	K	Na	Ca	Mg	Al
H ₂ O	-----mg dm ⁻³ -----			-----cmol _c dm ⁻³ -----		
6,20	6,00	43,00	22,00	2,00	0,50	0,00
H + Al	SB	t	T	V	m	M.O.
-----cmolc dm ⁻³ -----				-----%-----		dag kg ⁻¹
1,70	2,70	2,70	4,40	61,40	0,00	2,50
Análise física / classificação textural						
<u>Areia Silte Argila</u>			Classificação (SBCS)			
g kg ⁻¹						
870	10	120	arenosa/franco arenosa			

Inicialmente foram cultivadas plantas de *C. ensiformis* e *C. juncea* em vasos com 15,0 dm³ de substrato até o seu florescimento. Foram semeadas 04 sementes do feijão de porco e 20 sementes da crotalária por vaso. Quando as plantas atingiram 50% de florescimento (tempo de 75 dias de cultivo para o feijão de porco e 110 dias de cultivo para a crotalária) procedeu-se a obtenção do solo rizosférico. Após a secção e eliminação da parte aérea, retiraram-se as raízes dos vasos, cuidadosamente, agitando-as brevemente para eliminar o solo não rizosférico. Foi considerado como rizosférico o solo fortemente aderido à raiz. Retiraram-se amostras do solo aderido às raízes (1-2 mm) das duas espécies de adubos verdes e também solo de uma testemunha (solo sem cultivo ou não rizosférico). Essas

amostras após serem passadas por peneira de 2 mesh foram secas ao ar e em seguida foi determinado o teor de água. Posteriormente, foram pesadas e acondicionadas em quantidades de 150g em potes herméticos (SANTOS et al., 2007).

Os tratamentos foram compostos pela combinação entre dois tipos de solos (rizosférico e não-rizosférico), sendo dois solos rizosféricos (cultivados) e um não rizosférico (não cultivado) e quatro níveis de contaminação do substrato pelo herbicida sulfentrazone (0, 200, 400 e 800 g ha⁻¹), disposto em esquema fatorial 3x4, em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições.

As doses do herbicida sulfentrazone foram aplicadas nas amostras de solo rizosférico e não-rizosférico por meio de uma seringa, sendo a calda distribuída uniformemente. O produto comercial utilizado no experimento foi o Boral 500^(R) SC, fabricado pela FMC. Após aplicação do herbicida efetuou-se a incubação das amostras, mantendo-se o teor de água em torno de 70% da capacidade de campo.

Determinou-se a respiração da microbiota do solo, avaliada por meio da quantidade de CO₂ evoluído nas seguintes datas: 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 dias após o início da incubação. O gás foi capturado em frascos contendo 10 mL de NaOH, com concentração de 0,5 mol L⁻¹, em sistema hermeticamente fechado, isento de CO₂ e umidade e para sua liberação, foram adicionados 10 mL de BaCl₂ com concentração de 0,05 mol L⁻¹, sendo posteriormente titulado com HCl em 0,25 mol L⁻¹, para quantificação, de acordo com Curl & Rodriguez-Kabana (1972) & Stotzky (1965).

Ao final do período de incubação, determinou-se o Carbono da Biomassa Microbiana (CBM) pelo método descrito por Vance et al. (1987), utilizando-se, no lugar do clorofórmio (fumigação), forno de microondas (irradiação) (ISLAM & WEIL, 1998).

Com valores de CO₂ evoluído e CBM, foi determinado o quociente metabólico (qCO₂), fornecido pela razão entre o primeiro e o segundo parâmetros.

As mesmas amostras de solo utilizadas para respirometria foram reutilizadas para o cultivo do milheto (*P. glaucum*), como espécie indicadora da presença de resíduos do herbicida sulfentrazone. Para isso, coletaram-se, de cada unidade experimental, sub-amostras de 80 cm³, as quais foram colocadas em copos plásticos de 200 ml, para cultivo da espécie bioindicadora por 21 dias. Avaliaram-se no

milheto a altura média de plantas (cm), a massa seca da parte aérea (mg) e o nível de intoxicação visual (%) recomendado por EWRC (1964).

Também foram coletadas amostras para avaliação cromatográfica dos resíduos de sulfentrazone no solo. A extração para determinação dos resíduos de sulfentrazone no solo foi realizada no laboratório de Fitorremediação do CEUNES/UFES empregando-se 80 mL de metanol para cada 40 g de solo, após agitação por 16 h em um agitador operado a 180 rotações por minuto (rpm). Após a etapa de agitação, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 3.200 (rpm) para separação em centrífuga rotor basculante (ângulo variável) baby® I modelo 206-BL, cruzeta horizontal com 08 tubos de 15ml – FCR 2318. Em seguida, uma parte do extrato sobrenadante foi retirado com auxílio de seringa e filtrado a 0,45 µm em membrana de PTFE da Millipore® para “vials” de 1,5 mL, os quais foram submetidos à análise cromatográfica.

A análise cromatográfica foi realizada no Laboratório de Fitoquímica do CEUNES/UFES, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando um equipamento Waters 2695, equipado com detector UV/DAD, auto-injetor e forno para colunas. A condição cromatográfica foi otimizada e validada de acordo com o descrito por Ohmes & Mueller (2007) e foi utilizada: fase móvel constituída de acetonitrila - ácido fosfórico 0,1% (60:40); coluna RP-18, 250 x4,6 mm, 5 µm; fluxo de 1 mL/min; injeção de 10 µL, detecção em 220 nm e temperatura da coluna de 30°C. As soluções-padrão foram preparadas a partir do Padrão de sulfentrazone com teor declarado de 99,8% na concentração de 0,01 mg/mL.

Os dados foram submetidos à análise de variância. Para os efeitos significativos, compararam-se as médias entre as variáveis biológicas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância, com o auxílio do *software* SISVAR® (FERREIRA, 2014). As análises de regressão relativas à altura, massa seca da parte aérea e intoxicação visual das plantas de milho foram realizadas com o uso do *software* Sigma Plot® 12.0.

Nas mesmas amostras utilizadas para as avaliações microbiológicas, retiraram-se amostras compostas dos tratamentos e por meio da técnica de PCR-DGGE, procedeu-se a análise da diversidade bacteriana, realizada no Laboratório de Genética de Microrganismos do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Foram analisados três tratamentos da *C. ensiformis* (feijão de porco) (doses 0 g ha⁻¹, 200 g

ha⁻¹ e 800 g ha⁻¹) e três tratamentos da *C. juncea* (crotalária) (doses 0 g ha⁻¹, 200 g ha⁻¹ e 800 g ha⁻¹) de solo rizosférico e não rizosférico (Tabela 2). A extração do DNA total do solo foi realizada utilizando o kit de Extração de DNA de Solos (Norgen Biotek – código 26500), segundo o protocolo fornecido pelo fabricante.

TABELA 2. Identificação e descrição das amostras de solos utilizados para análise molecular da diversidade bacteriana

Nº de amostras	Sigla	Espécie	Tipo de solo	Tratamento/Dose de herbicida
1	FR0	Feijão de porco	Rizosférico	0 g ha ⁻¹
2	FR200	Feijão de porco	Rizosférico	200 g ha ⁻¹
3	FR800	Feijão de porco	Rizosférico	800 g ha ⁻¹
4	FNRO	Feijão de porco	Não rizosférico	0 g ha ⁻¹
5	FNR200	Feijão de porco	Não rizosférico	200 g ha ⁻¹
6	FNR800	Feijão de porco	Não rizosférico	800 g ha ⁻¹
7	CR0	Crotalária	Rizosférico	0 g ha ⁻¹
8	CR200	Crotalária	Rizosférico	200 g ha ⁻¹
9	CR800	Crotalária	Rizosférico	800 g ha ⁻¹
10	CNR0	Crotalária	Não rizosférico	0 g ha ⁻¹
11	CNR200	Crotalária	Não rizosférico	200 g ha ⁻¹
12	CNR800	Crotalária	Não rizosférico	800 g ha ⁻¹

Para verificar a quantidade e a qualidade do DNA obtido as amostras foram separadas por eletroforese em gel de agarose 0,8 % acrescido de SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen). A estimativa da concentração de DNA foi feita por comparação com o padrão de intensidade da banda do marcador do fago Lambda (λ), nas concentrações de 25 e 50 ng. Os géis foram visualizados sob luz UV 254 nm e as imagens foram capturadas utilizando o sistema de fotodocumentação L-PIX EX (Loccus Biotecnologia).

Para aumentar a sensibilidade e para facilitar a análise dos fragmentos de mesmo tamanho, a técnica de Nested-PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foi empregada. Na primeira reação de PCR de 25 μ L foram utilizados 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), tampão de reação 1X, 200 mol/L de cada dNTP, 0,1 μ g μ L⁻¹ de BSA (Promega), 2,0 mmol L⁻¹ de MgCl₂ e 0,5 mol/L dos *primers* 27f e 1512r descritos na Tabela 3. Estes *primers* amplificam a região 16S do rDNA de Bactéria, e geram um fragmento de aproximadamente 1500 pb. As amplificações foram conduzidas segundo os seguintes parâmetros: 5 minutos de desnaturação inicial a

94 °C, anelamento com 30 ciclos de 94 °C por 60 segundos, 58°C por 60 segundos e 72 °C por 60 segundos, seguida de uma extensão final a 72 °C por 5 minutos.

Cinco microlitros dos produtos de PCR foram separados em eletroforese em gel de 1,5% de agarose acrescido de SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) e o gel foi visualizado sob luz UV, sendo as imagens capturadas utilizando o sistema de fotodocumentação L-PIX EX (Loccus Biotecnologia).

TABELA 3. Sequências de *primers* utilizados na amplificação da região 16S do rDNA de Bactéria por Nested-PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

	<i>Primers</i>	Sequência (5'-3')	Referência
1ª reação	27f	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Suzuki & Giovannoni, 1996
	1512r	ACGGCTACCTTGTACGACT	Kane et al., 1993
2ª reação	338f	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	Muyzer et al., 1996
	518r	ATT ACC GCG GCT GCTGG	Muyzer et al., 1996

Os produtos da segunda reação de PCR foram avaliados em um gel de 8% de poliacrilamida e gradiente de concentração entre 45% e 65% definido a partir da mistura de soluções de uréia e formamida deionizada. A eletroforese foi realizada a 70 V e 60°C, por 16 horas, em um equipamento Dcode TM “Universal Mutation Detection System” (BIO-Rad, Richmond, EUA).

Após a eletroforese foi realizada a coloração do gel com nitrato de prata para visualização das bandas. Primeiramente utilizou-se a solução de fixação (etanol 10%; ácido acético 1%) por 20 minutos em um recipiente de vidro. O gel foi lavado com água e adicionou-se a solução de pré-tratamento (ácido nítrico 1,5%) por 3 minutos. Lavou-se novamente o gel e adicionou-se a solução por impregnação (nitrato de prata 0,2%). O tempo de impregnação foi de 20 minutos, sendo excesso de prata retirado na lavagem com água. Adicionou-se então, a solução de revelação (carbonato de cálcio 3%; formaldeído 37%). O tempo total para revelar as bandas foi de 5 a 7 minutos. Posteriormente, a solução de bloqueio com ácido acético glacial (5%) foi adicionada por 5 minutos, encerrando o processo de coloração. O gel foi transferido para uma placa de vidro contendo papel celofane, e seco à temperatura ambiente.

Os géis foram fotografados e as imagens foram analisadas com o software *Bionumerics* (Applied Maths, Saint-Martens-Latem). A observação do padrão de bandas no gel das amostras de solo foi utilizada para construção de uma matriz

binária. A partir dessa matriz, foi calculada a dissimilaridade entre os tratamentos avaliados utilizando-se o complemento do índice de Jaccard para posterior agrupamento dos isolados pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean*).

Resultados e Discussão

Atributos Biológicos

Por meio da evolução de CO₂ foi possível avaliar os efeitos da atividade microbiana sobre as quatro doses do herbicida sulfentrazone no solo, durante o período de cultivo das duas espécies fitorremediadoras.

Após 45 dias de avaliação foi observada maior respiração microbiana ou desprendimento de CO₂ em solos previamente cultivados com as espécies remediadoras, quando comparadas aos solos não cultivados (Tabela 4 e 5).

Pires et al. (2005), trabalhando com o herbicida tebuthiuron e Madalão et al. (2016) trabalhando com o sulfentrazone, observaram que o solo rizosférico de *C. ensiformis* apresentou maior produção de CO₂ se comparado ao solo não rizosférico, atribuindo tal fato à fitoestimulação da microbiota associada à rizosfera. Este resultado pode ser atribuído aos exsudatos liberados pelas raízes das plantas que auxiliam na multiplicação e proliferação de microrganismos responsáveis pela degradação do contaminante (WALKER et al., 2003).

Não houve diferença significativa entre os tipos de solos no desprendimento de C-CO₂ para as quatro doses avaliadas, após o cultivo de *C. ensiformis*. Entretanto, observa-se que após o cultivo de *C. juncea*, em três doses avaliadas (0, 200 e 800 g ha⁻¹), o solo rizosférico apresentou diferença significativamente positiva. Este resultado pode ser atribuído à maior atividade dos microrganismos, fazendo com que ocorresse maior liberação de CO₂ ao meio. Alguns autores atribuem maior desprendimento de C-CO₂ nos solos tratados com herbicidas ao fato de este servir como fonte de carbono e energia aos microrganismos (COSTA et al., 1997; MORENO et al., 2007).

Houve diferença significativa positiva em relação ao CBM para o solo rizosférico, nas doses 0 e 200 g ha⁻¹, nos solos previamente cultivados por *C.*

ensiformis, todavia, com o incremento das doses, essa diferença não foi observada (Tabela 4). Madalão et al. (2016), trabalhando com o sulfentrazone na dose 1000g ha⁻¹ verificou que o pré-cultivo da *C. ensiformis* favoreceu o aumento nos valores do CBM e concluiu que esse resultado reflete o efeito positivo do ambiente rizosférico para os microrganismos, mesmo na presença do herbicida. Gandini (2011), trabalhando com atividade microbiana rizosférica, afirmou que a resposta de aumento da biomassa em ambiente rizosférico pode indicar a predisposição da espécie para fins de fitorremediação de ambientes onde se utiliza o sulfentrazone.

TABELA 4. Evolução de CO₂, carbono da biomassa microbiana (CBM) e quociente metabólico após 45 dias de incubação de solo rizosférico, cultivado previamente com *Canavalia ensiformis* em comparação com solo não rizosférico (não cultivado)

Dose g ha ⁻¹	C-CO ₂ (acumulado)		CBM		qCO ₂	
	Não		Não		Não	
	Rizosférico	rizosférico	Rizosférico	rizosférico	Rizosférico	rizosférico
	mg kg ⁻¹		mg kg ⁻¹			
0	2,06 a	1,45 a	0,38 a	0,16 b	5,52 b	9,37 a
200	2,00 a	1,47 a	0,38 a	0,13 b	5,53 b	11,82a
400	2,00 a	2,06 a	0,26 a	0,28 a	7,94 a	7,14 a
800	2,16 a	1,60 a	0,39 a	0,40 a	5,62 a	3,98 a
CV(%)	26,52		23,37		16,32	

*Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

TABELA 5. Evolução de CO₂, carbono da biomassa microbiana (CBM) e quociente metabólico, após 45 dias de incubação de solo rizosférico, cultivado previamente com *Crotalaria juncea*, em comparação com solo não rizosférico (não cultivado)

Dose g ha ⁻¹	C-CO ₂ (acumulado)		CBM		qCO ₂	
	Não		Não		Não	
	Rizosférico	rizosférico	Rizosférico	rizosférico	Rizosférico	rizosférico
	mg kg ⁻¹		mg kg ⁻¹			
0	2,44 a	1,45 b	0,39 a	0,16 b	6,35 b	9,37 a
200	2,41 a	1,47 b	0,21 a	0,13 a	11,90 a	11,82 a
400	2,18 a	2,06 a	0,43 a	0,28 b	5,30 a	7,14 a
800	2,45 a	1,60 b	0,19 b	0,40 a	12,85 a	3,98b
CV(%)	24,42		27,20		15,21	

*Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Quando se analisam os solos com pré-cultivo da *C. juncea*, percebe-se que houve diferença significativa nas doses 0 e 400 g ha⁻¹, podendo ser notado um melhor comportamento da microbiota na dose 400 g ha⁻¹, enquanto que na maior dose testada a diferença significativa foi negativa para os microrganismos, reduzindo consideravelmente sua população. Isso pode ter ocorrido em razão do esgotamento das fontes nutricionais e da morte das células microbianas, estando de acordo com as observações de Anhalt et al. (2000) e Arthur et al. (2000). Provavelmente na dose 800 g ha⁻¹, houve supressão dos microrganismos e dessa forma, concluiu Madalão et. al. (2016), que os efeitos negativos das práticas agrícolas efetivadas no campo sobre a microbiota podem ser verificados pela variação na biomassa microbiana.

Santos et al. (2010) avaliaram a atividade microbiana rizosférica de *Stizolobium aterrimum*, durante o processo de fitorremediação de solo contaminado com o herbicida *trifloxysulfuron sodium* e observaram menor valor de CBM no solo tratado com o herbicida e não cultivado com a espécie fitorremediadora.

Vieira et al. (2007), trabalhando com as dose 1400 g ha⁻¹ observaram que o sulfentrazone também promoveu redução da biomassa microbiana do solo cultivado com soja até 46 dias após a aplicação do herbicida (DAH) e, VIVIAN et al., (2006), trabalhando com a dose de 900 g ha⁻¹ em aplicação sobre a cana-de-açúcar, levou à redução da CBM, após duas aplicações, aos 197 e 640 DAH.

O quociente metabólico (qCO₂) estabelece a relação entre a liberação diária de C-CO₂ e o CBM. Seus valores menores apontam para uma maior estabilidade da

biomassa microbiana e do sistema. Sendo assim, o qCO_2 pode indicar o equilíbrio da microbiota do solo (CHAER & TÓTOLA, 2007).

Analisando-se os resultados da Tabela 4, nota-se que quando houve prévio cultivo com *C. ensiformis*, o solo rizosférico apresentou maior equilíbrio nas doses 0 e $200g\,ha^{-1}$. No entanto, no solo previamente cultivado com *C. juncea*, houve diferença significativa positiva apenas na dose $0\,g\,ha^{-1}$, já que na dose $800\,g\,ha^{-1}$, o resultado mostra que houve maior estabilidade do sistema em solo sem cultivo prévio (Tabela 5). Esse fato pode ser atribuído à supressão microbiana, fazendo com que ela não conseguisse desempenhar sua atividade.

Não foi possível realizar o ajuste da regressão para os valores de C- CO_2 , CBM, e qCO_2 .

Analisando os resultados de altura e massa seca da parte aérea das plantas de milheto, decorrentes do bioensaio (Figuras 1 e 2), percebe-se que o solo previamente cultivado com *C. ensiformis* favoreceu considerável desenvolvimento da espécie bioindicadora até a dose $800\,g\,ha^{-1}$, embora apresentando diminuição quando houve o aumento da dose. Resultado diferente foi observado no solo pré-cultivado por *C. juncea*, onde a bioindicadora se desenvolveu somente até a dose $200g\,ha^{-1}$. Nas doses subsequentes as plantas não toleraram o herbicida, apontando assim, para uma menor eficiência na descontaminação do solo por esta espécie (Figuras 3 e 4).

Esses resultados diferem dos encontrados por Madalão et al. (2012b), que pesquisando o uso de leguminosas na fitorremediação do sufentrazone nas mesmas doses, encontraram que a menor redução na altura e biomassa fresca e seca do *P. glaucum* ocorreu com o pré-cultivo da *C. juncea*.

A degradação de substâncias contaminantes no solo depende da presença de várias enzimas que realizam metabolismo para seu crescimento e, dessa forma, conseguem remediar os compostos químicos, reduzir as concentrações presentes no ambiente ou torná-los menos tóxicos (LEONEL et al., 2010), favorecendo assim o desenvolvimento subsequente de espécies.

Diante disso, um fator importante na relação planta x microorganismo de solo é a idade da planta. Segundo Rovira (1965), em fase de florescimento, há maior liberação de exsudados radiculares, contribuindo para maior número de microorganismos associados à rizosfera. Dessa forma, é possível concluir que, à medida que as plantas crescem, sua ação fitorremediadora é potencializada,

considerando-se a interação com microorganismos, mas também, pela maior capacidade de absorção (PROCÓPIO et al., 2008).

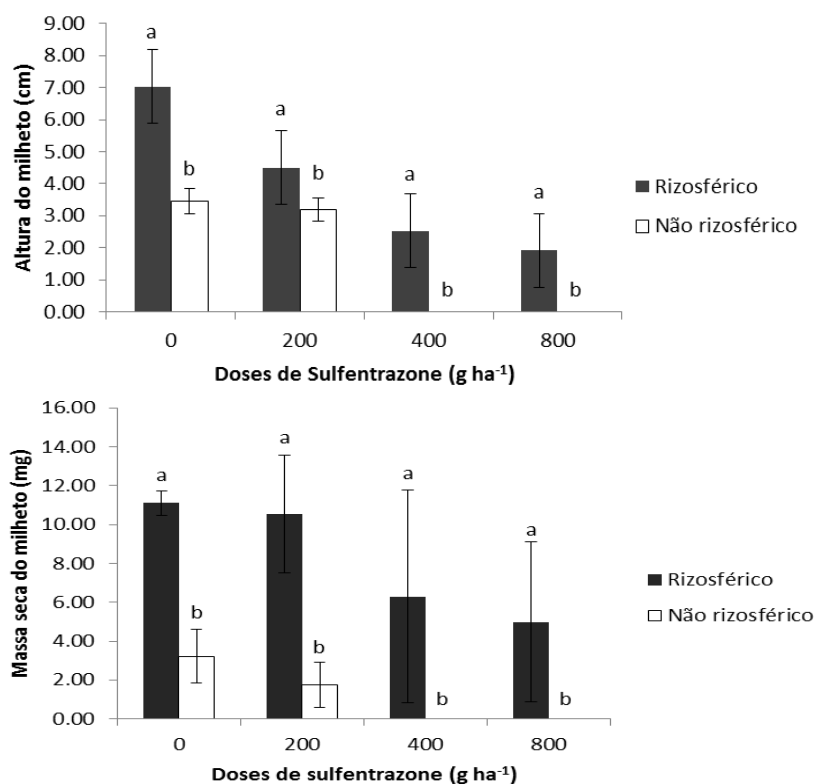


FIGURA 1. Altura e massa seca de *P. glaucum* após cultivo prévio de *C. ensiformis* e em solo sem cultivo em função de doses de sulfentrazone. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

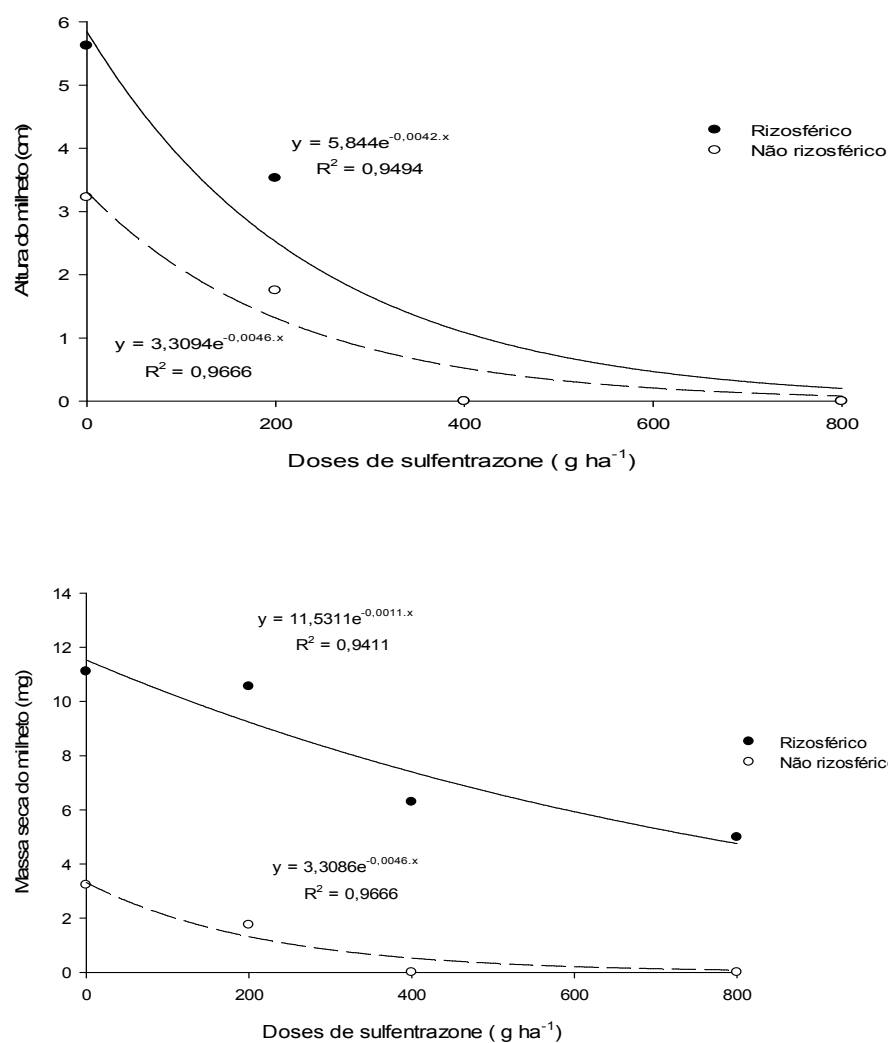


FIGURA 2. Altura e massa seca de *P. glaucum* após cultivo prévio de *C. ensiformis* e sem cultivo em função de doses de sulfentrazone.

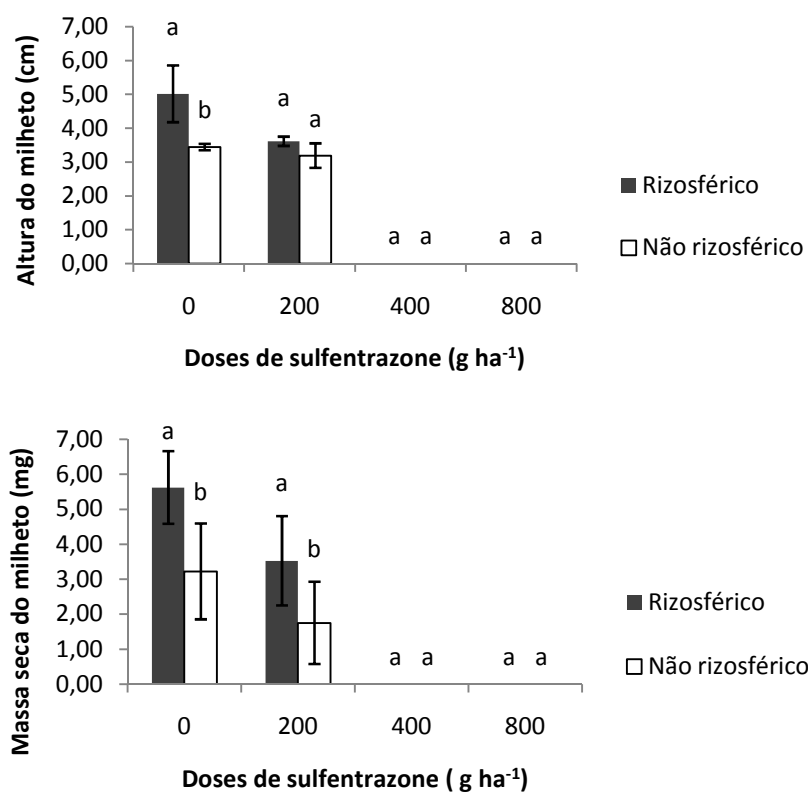


FIGURA 3. Altura e massa seca de *P. glaucum* após cultivo prévio de *C. juncea* e em solo sem cultivo em função de doses de sulfentrazone. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

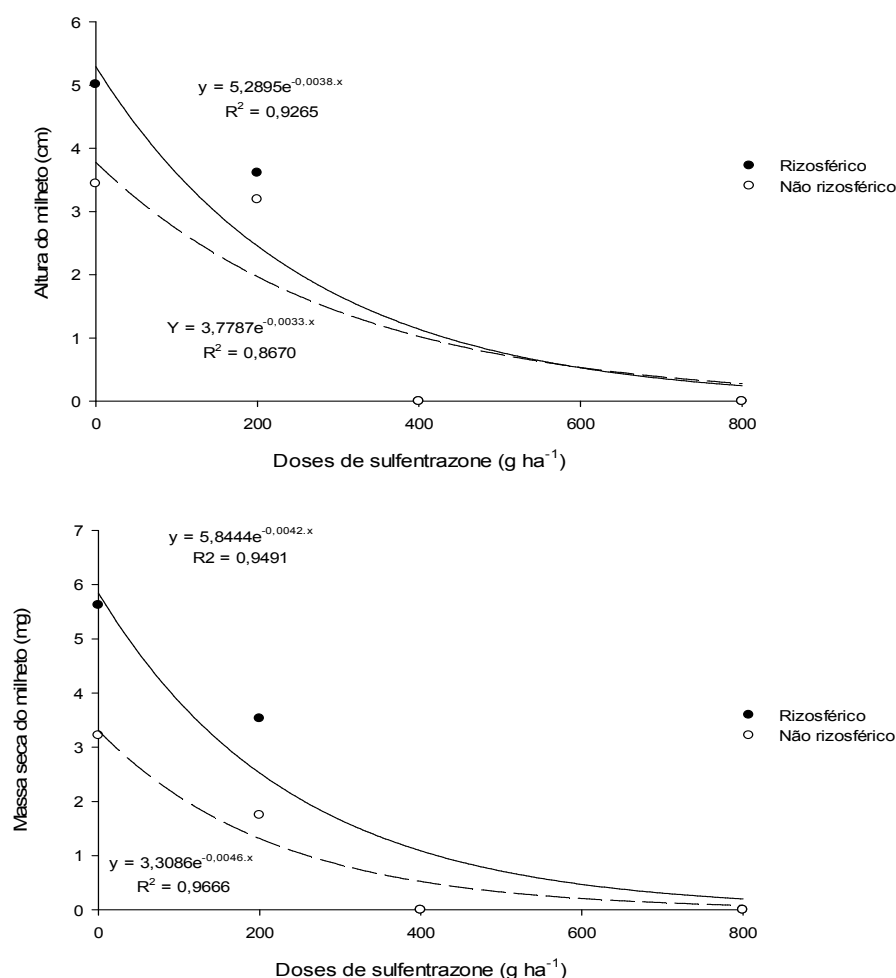


FIGURA 4. Altura e massa seca de *P. glaucum* após cultivo prévio de *C. juncea* e sem cultivo em função de doses de sulfentrazone.

Os resultados de intoxicação das plantas (Tabelas 6 e 7) indicam que não houve diferença significativa entre o solo rizosférico e não rizosférico pré-cultivado com o feijão de porco aos 7 dias após plantio (DAP). Aos 14 DAP houve diferença significativa nas doses 200 e 400 g ha⁻¹ e aos 21 DAP apenas na dose 200 g ha⁻¹ (Tabela 6). No pré-cultivo pela crotalária, houve diferença significativa entre o solo rizosférico e não rizosférico aos 7 DAP nas doses 400 e 800 g ha⁻¹, aos 14 e 21 DAP houve diferença significativa apenas na dose 200 g ha⁻¹. Esses resultados estão coerentes com os dados de altura e matéria seca da bioindicadora e demonstram, primeiramente, que a presença da fitorremediadora contribuiu para reduzir a intoxicação do milho. Outra inferência é a diferença na atividade rizosférica entre as duas espécies de adubos verdes, haja vista que, para a crotalária, houve morte total das plantas observada nas maiores doses testadas aos 14 e 21 dias de

avaliação. Com isso, nota-se diferença entre as plantas na degradação do herbicida. Esses resultados são semelhantes aos encontrados no trabalho de Madalão et al. (2012b), que observaram maior eficiência da *C. juncea* na imobilização do sulfentrazone até 400 g ha⁻¹.

TABELA 6. Nível de intoxicação visual do *P. glaucum*, após cultivo da *C. ensiformis* aos 7, 14 e 21 dias após plantio da espécie bioindicadora

Intoxicação visual (%)						
Dose g ha ⁻¹	7 DAP		14 DAP		21 DAP	
	Rizosférico	Não Rizosférico	Rizosférico	Não Rizosférico	Rizosférico	Não Rizosférico
0	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
200	21 a	19 a	48 b	68 a	68 b	86 a
400	91 a	96 a	76 b	100 a	91 a	100 a
800	86 a	99 a	94 a	100 a	99 a	100 a
CV(%)	22,2		17,14		10,10	

*Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

TABELA 7. Nível de intoxicação visual do *P. glaucum*, após cultivo da *C. juncea* aos 7, 14 e 21 dias após plantio da espécie bioindicadora

Intoxicação visual (%)						
Dose g ha ⁻¹	7 DAP		14 DAP		21 DAP	
	Rizosférico	Não Rizosférico	Rizosférico	Não Rizosférico	Rizosférico	Não Rizosférico
0	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
200	5 a	19 a	36 b	68 a	53 b	86 a
400	73 b	96 a	99 a	100 a	100 a	100 a
800	74 b	99 a	100 a	100 a	100 a	100 a
CV(%)	35,56		10,53		10,02	

*Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Analisando-se os resultados apresentados pelas Figuras 5 e 6 é possível observar a diferença nos níveis de intoxicação da planta bioindicadora cultivada em sucessão a *C. ensiformis*, *C. juncea* e sem cultivo prévio. Notam-se sintomas menos acentuados na bioindicadora aos 7, 14 e 21 dias após plantio (DAP) em todas as doses para o solo rizosférico com o pré-cultivo do feijão de porco. Observa-se também a alta fitotoxicidade do herbicida nas doses 400 e 800 g ha⁻¹ sobre a bioindicadora no solo rizosférico da crotalária, onde houve intoxicação de 100% nas avaliações aos 14 e 21 dias.

O solo sem prévio-cultivo apresentou os piores níveis de intoxicação, sendo possível notar morte total das plantas de milho, ou seja, intoxicação visual de 100%, a partir da avaliação aos 14 dias nas doses 400 e 800 g ha⁻¹. A alta sensibilidade do *P. glaucum* ao sulfentrazone foi comprovada por Dan et al. (2011), ao analisarem a atividade residual do sulfentrazone sobre o milho cultivado em sucessão na cultura da soja, aplicado em pré-emergência, na dose 600 g ha⁻¹.

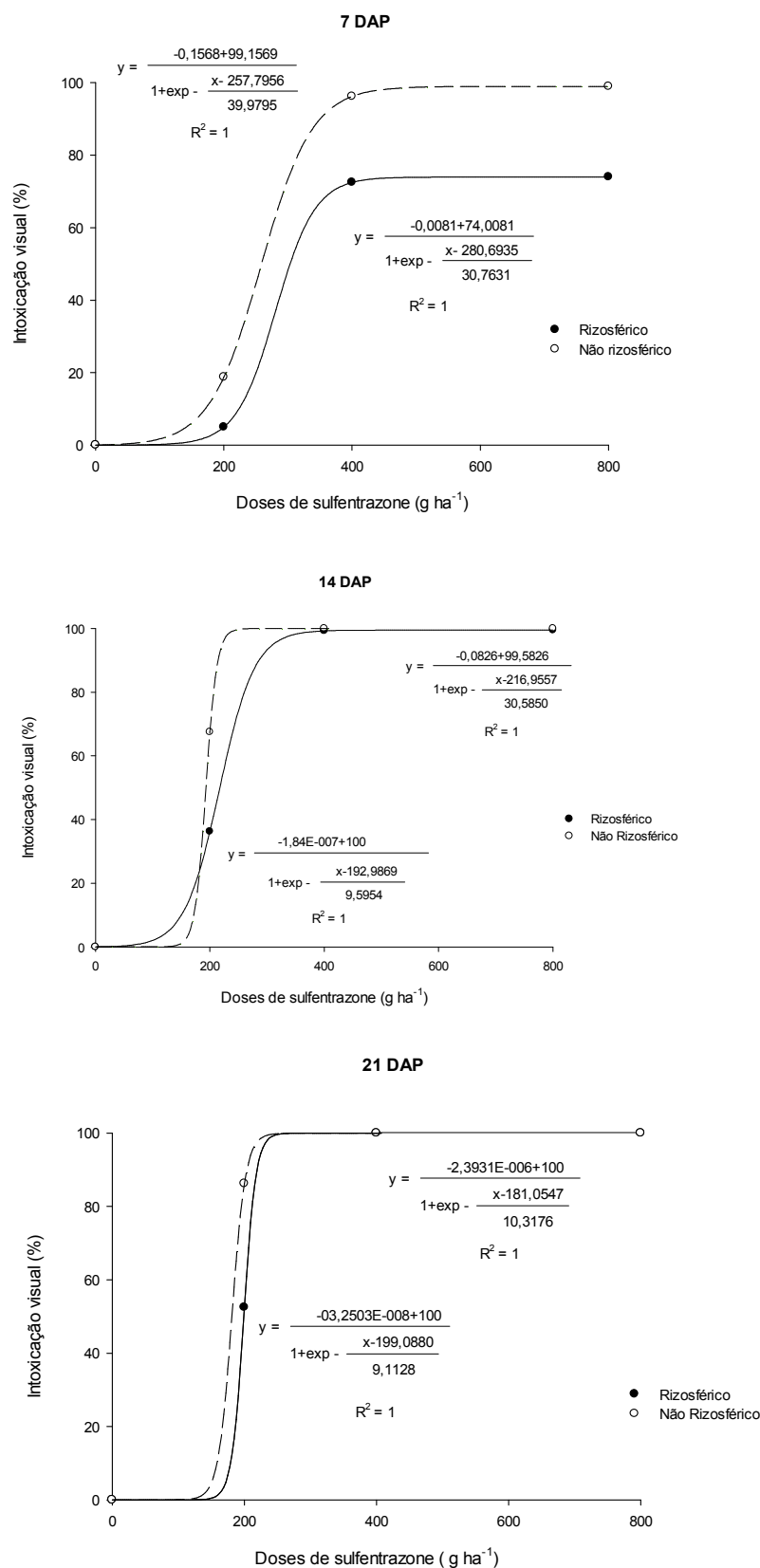


FIGURA5. Nível de intoxicação visual do *P. glaucum*, após plantio de *C. ensiformis* e em solo sem cultivo aos 07, 14 e 21 dias após a semeadura, em função de doses de sulfentrazone.

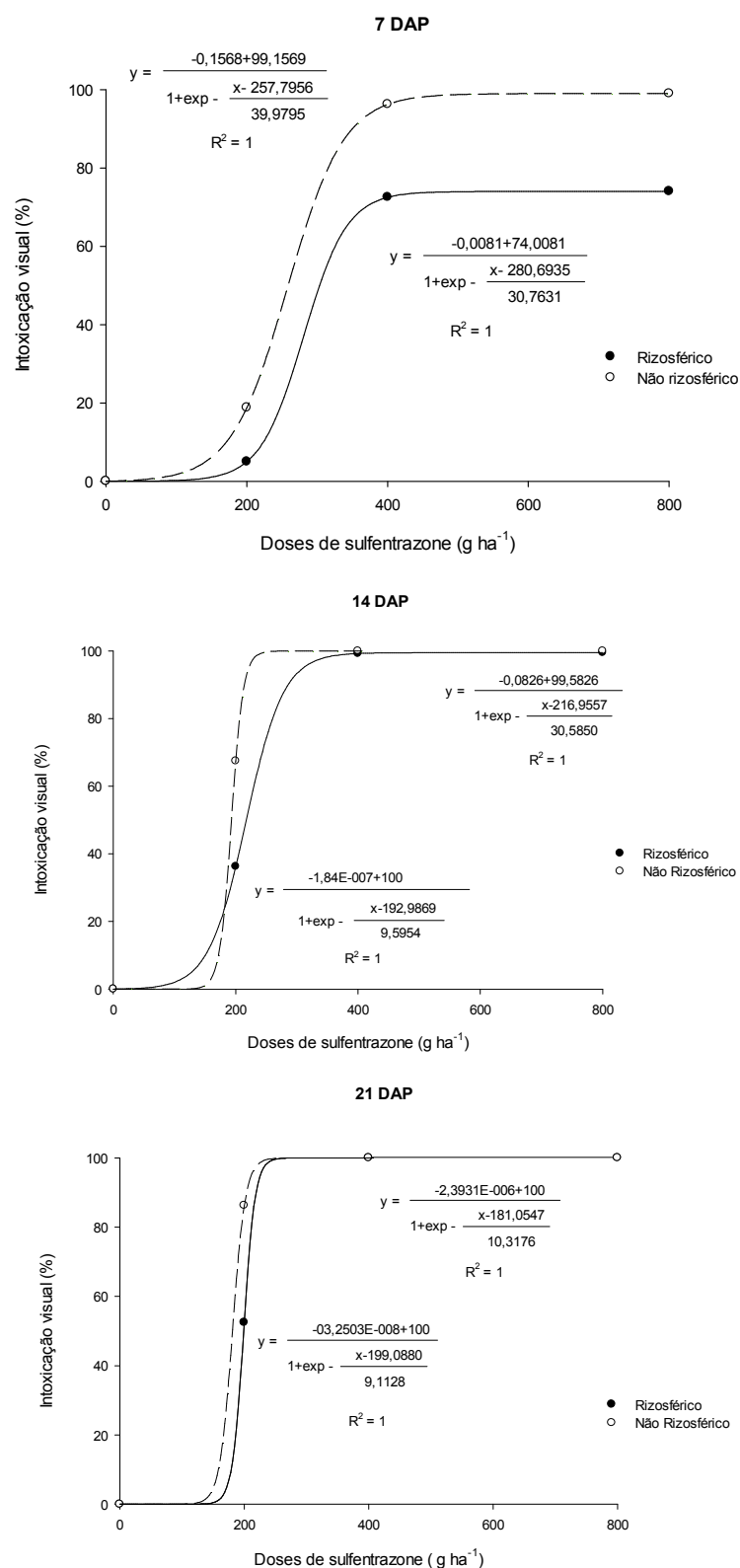


FIGURA 6. Intoxicação visual do *P. glaucum*, após plantio de *C. juncea* e em solo sem cultivo aos 07, 14 e 21 dias após a semeadura, em função de doses de sulfentrazone.

Nas Figuras 7 e 8 são apresentados os resultados de resíduos de sulfentrazone avaliado por cromatografia líquida. É possível notar que, em todos os tratamentos, houve aumento no teor do herbicida no solo com o aumento das doses. Todavia, percebe-se que, nos solos rizosféricos, esses valores são menores do que na testemunha onde não foi cultivada previamente a fitorremediadora.

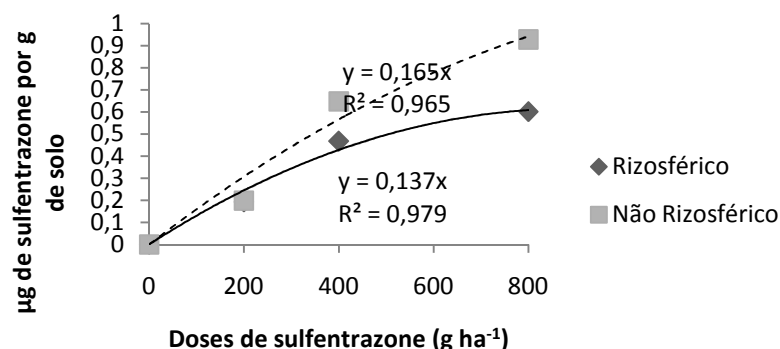


FIGURA 7. Teor médio de sulfentrazone encontrado em solo previamente cultivado com *C. ensiformis* e em solo não cultivado, em função de doses de sulfentrazone.

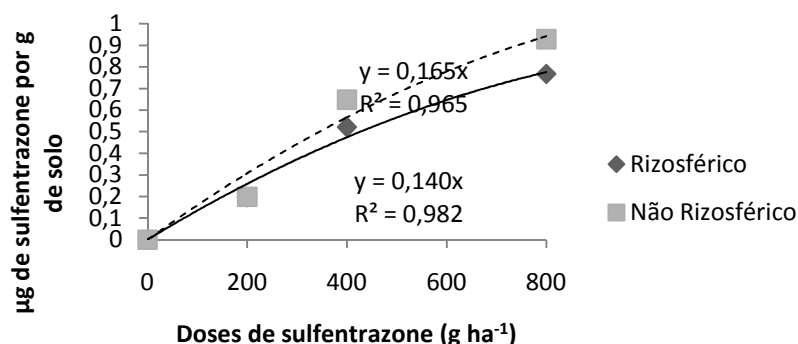


FIGURA 8. Teor médio de sulfentrazone encontrado em solo previamente cultivado com *C. juncea* e em solo não cultivado, em função de doses de sulfentrazone.

Comparando os solos previamente cultivados por plantas remediadoras, observa-se uma menor concentração da molécula de sulfentrazone no solo cultivado por *C. ensiformis* em todas as doses, apresentando uma diferença significativa quando houve o incremento das doses (Tabela 8).

Os solos sem nenhum pré-cultivo apresentaram o maior teor de herbicida quando comparado ao solo cultivado com *C. ensiformis* comprovando o efeito da presença da vegetação em acelerar a descontaminação. Todavia, no solo cultivado com *C. juncea*, em valores absolutos, também se observou um menor teor de sulfentrazone quando comparado ao solo não rizosférico. Contudo, sem diferença significativa em nenhuma dose avaliada (Tabela 9). O trabalho conduzido por Santos

et al. (2004) selecionou *C. ensiformis* como uma das mais eficientes espécies na fitorremediação do herbicida trifloxysulfuron sodium, bem como Pires et al. (2006) para o herbicida tebuthiuron.

TABELA 8. Teor de sulfentrazone presente em solo previamente cultivado por *C. ensiformis* e em solo sem cultivo

Dose g ha ⁻¹	Solo	
	Rizosférico	Não Rizosférico
	µg por gde solo	
0	0,00 a	0,00 a
200	0,19 a (9,5%)**	0,21 a
400	0,49 b (23,4%)**	0,64 a
800	0,60 b (34,8%)**	0,92 a
CV(%)	11,26	

*Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

**Porcentagem de redução de sulfentrazone comparada com o solo não rizosférico.

TABELA 9. Teor de sulfentrazone presente em solo previamente cultivado por *C. juncea* e em solo sem cultivo

Dose g ha ⁻¹	Solo	
	Rizosférico	Não Rizosférico
	µg por gde solo	
0	0,00 a	0,00 a
200	0,20 a (4,8%)**	0,21 a
400	0,56 a (12,5%)**	0,64 a
800	0,76 b (17,4%)**	0,92 a
CV(%)	13,03	

*Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

**Porcentagem de redução de sulfentrazone comparada com o solo não rizosférico.

Análise da diversidade bacteriana

A extração de DNA direto do solo consiste em três objetivos básicos: lise dos microrganismos representativos dentro da amostra, obtenção de DNA intacto com alta massa molar e remoção de inibidores a partir do DNA extraído para subsequentes manipulações moleculares. Após a extração do material genético das amostras do solo, o DNA foi quantificado por comparação da intensidade das

bandas do fago lambda a 25 e 50 ng μL^{-1} e a quantidade do DNA total extraído do solo das amostras foi estimada entre 10 a 30 ng μL^{-1} , como demonstrado na Figura 9. A qualidade do DNA foi verificada pela ausência de rastro no gel em todas as amostras.

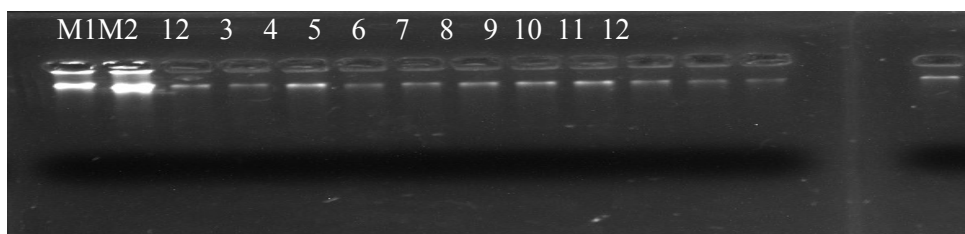


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 0,8 % do DNA total extraído de amostras de solos submetidas a diferentes doses de herbicida. **M1.** Lambda 25 ng; **M2.** Lambda 50 ng. Descrição amostras de 1 a 12 – Tabela 1.

O DNA total extraído das amostras de solos foi utilizado como molde para reação de amplificação do gene 16S rDNA de bactéria utilizando os *primers* 27f e 1512r, gerando fragmentos de aproximadamente 1500 pb (Figura 10).

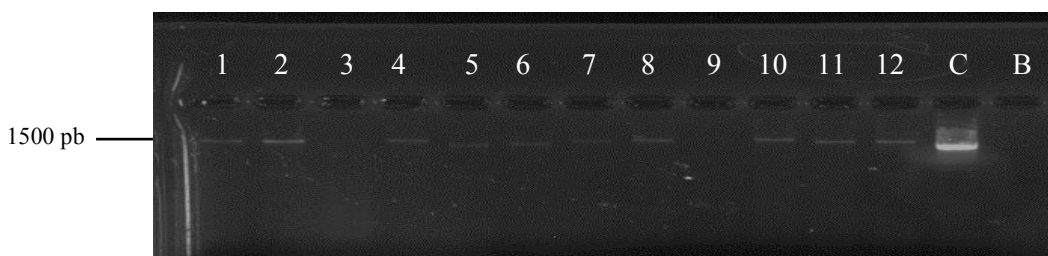


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR utilizando os *primers* 27F e 1512r de amostras de solos submetidas a diferentes doses de herbicida. Descrição amostras de 1 a 12 – Tabela 1.

Os produtos da primeira reação foram diluídos dez vezes e utilizados como molde para a segunda reação de PCR utilizando *primers* que amplificam a região V3 do rDNA 16S, GC-338f e 518r, gerando fragmentos de aproximadamente 198 pb (Figura 11).

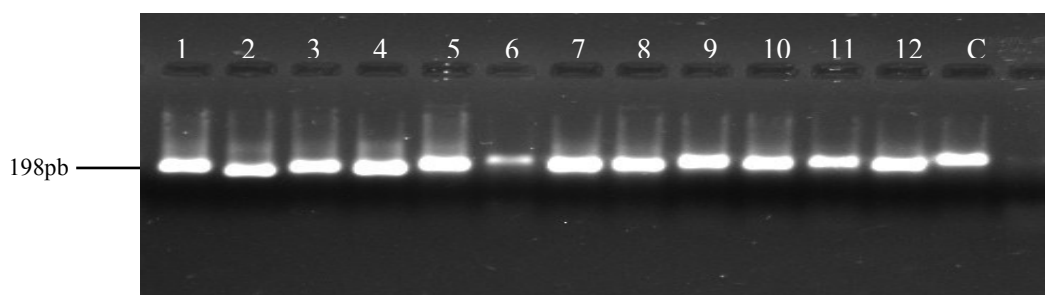


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR utilizando os *primers* GC-338f e 518r de amostras de solos submetidas a diferentes doses de herbicida. Descrição amostras de 1 a 12 – Tabela 1.

Os produtos da segunda reação de PCR foram separados por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE). Nos géis foi possível observar a existência de diferentes bandas, denominadas Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs). O número total de UTO's identificado em cada tratamento está relacionado com a riqueza de populações bacterianas, um dos parâmetros de biodiversidade. Foi observada uma diminuição do número de OTUs com o aumento da dose de herbicida, evidenciando que houve diminuição da riqueza de espécies de bactéria nestas áreas, devido à toxidez do agroquímico sobre a população de microrganismos (Figura 12).

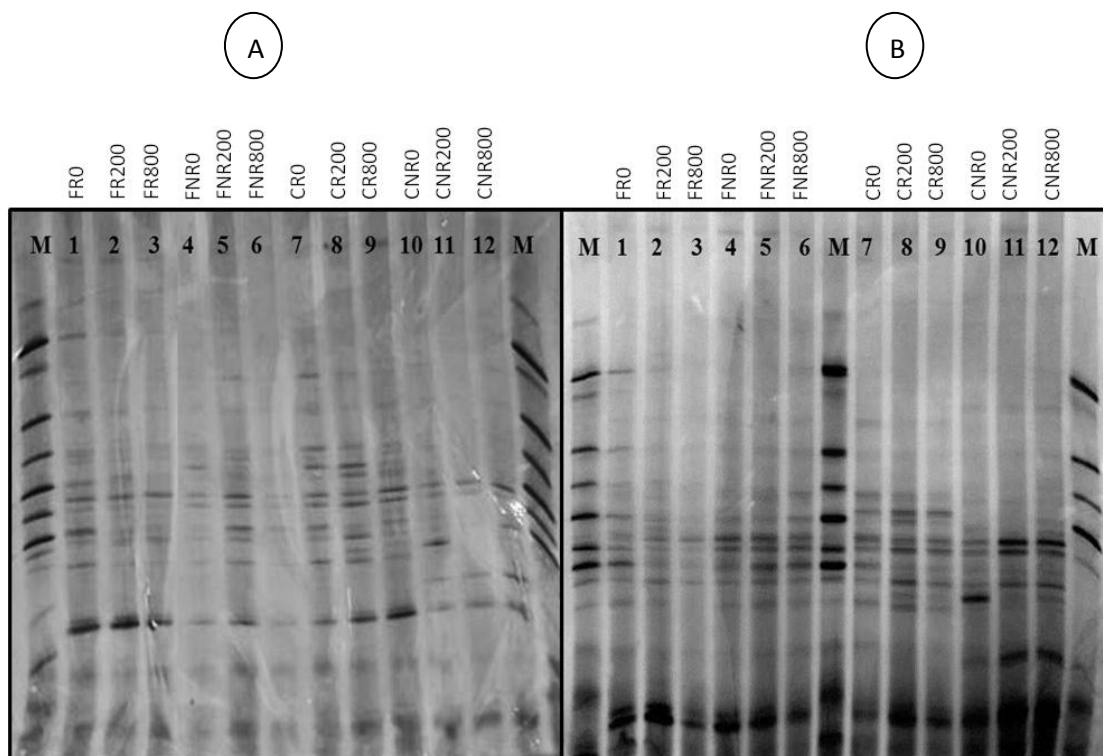


Figura 12. Géis de poliacrilamida com gradiente desnaturante dos produtos de amplificação da região 16S do rDNA do DNA total extraído de solos submetidas a diferentes doses de herbicida. M – marcador. A e B são repetições. Descrição das amostras na legenda.

Legenda:

FR0 – Feijão de porco Rizosférico dose 0 g ha⁻¹

FR200 – Feijão de porco Rizosférico dose 200 g ha⁻¹

FR800 – Feijão de porco Rizosférico dose 800 g ha⁻¹

FNR0 – Feijão de porco Não rizosférico dose 0 g ha⁻¹

FNR200 – Feijão de porco Não rizosférico dose 200 g ha⁻¹

FNR800 – Feijão de porco Não rizosférico dose 800 g ha⁻¹

CR0 – Crotalaria Rizosférico dose 0 g ha⁻¹

CR200 – Crotalaria Rizosférico dose 200 g ha⁻¹

CR800 – Crotalaria Rizosférico dose 800 g ha⁻¹

CNR0 – Crotalaria Não rizosférico dose 0 g ha⁻¹

CNR200 – Crotalaria Não rizosférico dose 200 g ha⁻¹

CNR800 – Crotalaria Não rizosférico dose 800 g ha⁻¹

A análise da diversidade bacteriana mostrou diferença no perfil das populações bacterianas que pode ser observada no dendograma (Figura 13) elaborado a partir dos perfis eletroforéticos de duas repetições do gel de DGGE. Apesar da diminuição na riqueza de bactéria com o aumento da dose do herbicida, este não foi um fator decisivo nos perfis bacterianos, uma vez que os perfis

bacterianos foram formados de acordo com a planta e a característica de solo (rizosférico e não rizosférico). Foram formados quatro perfis de bactérias: no primeiro encontramos todas as amostras de solos não rizosférico de feijão de porco e a amostra rizosférica de feijão de porco que foi aplicada 800 g ha⁻¹ de herbicida. No grupo dois estão presentes as amostras rizosféricas de feijão de porco com 0 e 200 g ha⁻¹ de herbicida. No terceiro e quarto grupo encontramos todas as amostras de solos rizosféricos e não rizosféricos de crotalária, respectivamente.

Os métodos métricos (UPGMA) para avaliação de diversidade, ou seja, aqueles baseados em distância, partem da premissa de que as OTUs mais semelhantes geneticamente entre si devem ser agrupadas. A semelhança entre quaisquer duas entidades poderia ser medida e as medidas que estão entre cada um dos pares poderiam ser usadas para se exprimir as relações de semelhança entre cada um dos componentes de um grupo. Para as amostras em estudo, as comunidades bacterianas tiveram perfil distinto ficando dependentes da origem, como revelou a análise de agrupamento (Figura 13). A comunidade proveniente da rizosfera do feijão de porco foi distinta da comunidade da rizosfera da crotalária, o que revela o efeito do tipo de cultivo sobre a diversidade funcional das bactérias na rizosfera das plantas. Houve a formação de quatro principais grupos funcionais de bactérias, o que indica que as bactérias pertencentes a cada um desses grupos tem o mesmo perfil genético e fazem uso semelhante de fontes de nutrição.

Analisando o dendograma, verifica-se que no primeiro grupo consta todas as amostras do solo não rizosférico do feijão de porco, mas também foi incluída a amostra do solo rizosférico que recebeu a dose de 800g ha⁻¹, ou seja, presume-se, que essa amostra do feijão de porco que recebeu a maior dose do herbicida, se igualou geneticamente ao perfil das bactérias do solo não rizosférico. Este resultado sugere que o herbicida em doses elevadas, pode suprimir ou provocar mutações nos microrganismos associados à rizosfera do feijão de porco. O que não ocorreu com as amostras de solo rizosférico também do feijão de porco que receberam as doses 0 e 200 g ha⁻¹, e compuseram um outro grupo genético. Porém, quando se analisam os resultados do bioensaio para o solo pré-cultivado com esta espécie (Figuras 1,2 e Tabela 6), conclui-se que o solo rizosférico teve um desempenho melhor que o não rizosférico, permitindo que a planta bioindicadora se estabelecesse até a dose 800 g ha⁻¹. Esta aparente contradição nos resultados demonstra que os microrganismos associados ao feijão de porco, responsáveis pela degradação do herbicida, podem

não ser constituídos somente por bactérias. Deve haver outros microrganismos, possivelmente fungos, convivendo na rizosfera dessa planta, responsáveis, também, por esta função. Martinez et al. (2010), estudando a degradação microbiana do sulfentrazone em solo Latossolo Vermelho distrófico brasileiro, identificaram os microrganismos *Nocardia brasiliensis* e *Penicillium sp* como potenciais degradadores do herbicida.

Quando se observa as amostras dos solos rizosférico e não rizosférico (grupos 3 e 4 no dendograma) da crotalária, verifica-se que para esta planta, nas três doses aplicadas, que houve um comportamento claramente distinto entre os dois tipos de solos. No entanto, ao contrário do feijão de porco, não foi observada mudança no perfil genético com aplicação da maior dose do herbicida. Sugerindo-se também, que há outros microrganismos que em cooperação com as bactérias dessa planta, realizam o mesmo trabalho. Como esta espécie de planta em comparação ao feijão de porco demonstrou comportamento menos eficiente na descontaminação do herbicida, pela avaliação do bioensaio, conclui-se pela análise da diversidade bacteriana que os microrganismos que atuam nas plantas são diferentes. Essa análise avançou na compreensão de que há grupos específicos de bactérias em associação às rizosferas do feijão de porco e crotalária.

Portanto, o uso da técnica PCR-DGGE foi capaz de detectar na microbiota do solo diferenças na atividade rizosférica entre as duas espécies de adubos verdes, ampliando os conhecimentos a respeito das associações entre as plantas e microrganismos.

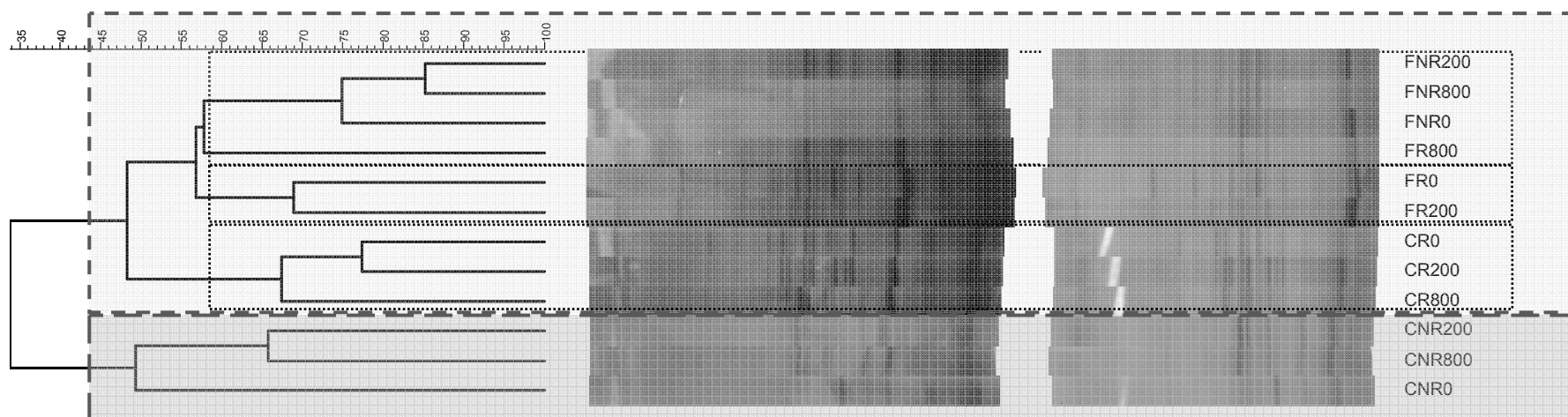


Figura 13. Dendrograma de similaridade genética obtido pelo método de agrupamento UPGMA gerado a partir da análise de bandas obtidas por PCR-DGGE com primers universais que amplificam a região do gene ribossomal 16S de bactéria de amostras de solos submetidas a diferentes doses do herbicida sulfentrazone. Descrição amostras – Tabela 1.

Legenda:

FR0 – Feijão de porco Rizosférico dose 0 g ha⁻¹
 FR200 – Feijão de porco Rizosférico dose 200 g ha⁻¹
 FR800 – Feijão de porco Rizosférico dose 800 g ha⁻¹
 FNR0 – Feijão de porco Não rizosférico dose 0 g ha⁻¹
 FNR200 – Feijão de porco Não rizosférico dose 200 g ha⁻¹
 FNR800 – Feijão de porco Não rizosférico dose 800 g ha⁻¹

CR0 – Crotalária Rizosférico dose 0 g ha⁻¹
 CR200 – Crotalária Rizosférico dose 200 g ha⁻¹
 CR800 – Crotalária Rizosférico dose 800 g ha⁻¹
 CNR0 – Crotalária Não rizosférico dose 0 g ha⁻¹
 CNR200 – Crotalária Não rizosférico dose 200 g ha⁻¹
 CNR800 – Crotalária Não rizosférico dose 800 g ha⁻¹

Conclusões

- O cultivo das espécies fitorremediadoras promoveu incremento da atividade microbiana rizosférica;
- A espécie *C. ensiformis* apresentou valores indicando uma maior atividade rizosférica da microbiota;
- A microbiota associada às espécies *C. ensiformis* e *C. juncea* mostraram potencial para descontaminação de solos com resíduo do herbicida sulfentrazone principalmente na dose 200 g ha⁻¹;
- O uso da técnica PCR-DGGE foi capaz de detectar na microbiota do solo diferenças genéticas em nível bacteriano na atividade rizosférica entre as duas espécies de adubos verdes. Verificou-se que os perfis genéticos bacterianos foram formados de acordo com a planta e a característica de solo (rizosférico e não rizosférico), o que indica que as bactérias pertencentes a essas amostras são dependentes das plantas, como revelou a análise de agrupamento. A análise avançou na compreensão de que há grupos distintos de microrganismos em associação à rizosfera do feijão de porco e de crotalária júncea e que eles podem não ser os principais responsáveis pelo processo de fitorremediação do sulfentrazone.

Referências

ANDERSON, T.A.; GUTHRIE, E.A. & WALTON, B.T. Bioremediation in the rhizosphere: plant roots and associated microbes clean contaminated soil. **Environment Science Technology**, v.27, n.13, p.2630-2636, 1993.

ANHALT, J.C.; ARTHUR, E.L.; ANDERSON, T.A. & COATS, J.R. Degradation of atrazine, metolachlor, and pendimethalin in pesticide-contaminated soils: effects of aged residues on soil respiration and plant survival. **Journal Environment Science Health**, v.35, n.4, p.417-438, 2000.

ARTHUR, E. L.; PERKOVICH, B. S.; ANDERSON, T. A.; COATS, J. R. Degradation of an atrazine and metolachlor herbicide mixture in pesticide-contaminated soils from two agrochemical dealerships in Iowa. **Water, Air, and Soil Pollution**, v.119, n.1-4, p.75-90, 2000.

BELO, A.F.; et al. Potencial de espécies vegetais na remediação de solo contaminado com sulfentrazone. **Revista Planta Daninha**, v.29, n.4, p.821-828, 2011.

BENEVENUTO, J.G.F. Efeitos de componentes mineralógicos e orgânicos de alguns latossolos na Adsorção de Herbicida Fluometuron. Viçosa-MG. 94p. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Viçosa, 1983

BLANCO, F.M.G.; VELINI, E.D.; BATISTA FILHO, A. Persistência do herbicida sulfentrazone em solo cultivado com cana-de-açúcar. **Revista Bragantina**, v.69, n.1, p.71 - 75, 2010.

BLANCO, F.M. G.; VELINI, E. D. Persistência do herbicida sulfentrazone em solo cultivado com soja e seu efeito em culturas sucedâneas. **Revista Planta Daninha**, v.23, n.4, p.693-700, 2005.

CARDOSO, E.J.B.N. et al. Recycling industrial and urban wastes in tropical agricultural soils. In: NIELSEN, C.J. (Ed.). **Recycling: processes, costs and benefits**. New York: Nova Science, 2011. Cap. 2, p.53-90.

CELIS, R.; REAL, M.; HERMOSÍN, M.C.; CORNEJO, J.; Sorption and leaching behaviour of polar aromatic acids in agricultural soils by batch and column leaching tests. **European Journal of Soil Science**, v.56, n.3, p.287-297, 2005.

CHAER, G. M.; TÓTOLA, M. R. Impacto do manejo de resíduos orgânicos durante a reforma de plantios de eucalipto sobre indicadores de qualidade do solo. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.31, n.6, p.1381-1396, 2007.

COSTA, M. A.; MONTEIRO, R. T. R.; TORNISIELO, V. L. Influência da adição de palha de cana-de-açúcar na degradação de 14C-ametrina em solo areia quartzosa. **Scientia Agrícola**, v.54, n.3, p.117-122, 1997.

COSTA, A. F. de S. et al. Obtenção de consórcio de microrganismos a partir de amostra de petróleo. **Revista Ciências e Tecnologia**, v.1, n.1, p.1-7, 2007.

COBUCCI, T.; PORTELA, C. M. O. Seletividade de herbicidas aplicados em diferentes estádios de desenvolvimento da cultura do arroz de terras altas. **Revista Planta Daninha**, v.19, n.3, p.359-366, 2001.

CUNNINGHAM, S. D.; ANDERSON, T. A.; SCHWAB, A. P. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. **Advances in Agronomy**, v.56, n.1, p.55-114, 1996.

CURL, E.A. & RODRIGUEZ-KABANA, R. Microbial interactions. In: WILKINSON, R.E., ed. **Research methods in weed science**. Atlanta-EUA, Southern Weed Science Society, 1972. p.162-194.

DAMIN, V. **Biodegradação, sorção e dessorção do herbicida 14C-Diuron em dois Latossolos tratados com lodo de esgoto**. 71p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, 2005.

DAN, H. A. et al. Atividade residual de herbicidas pré emergentes aplicados na cultura da soja sobre o milho cultivado em sucessão. **Revista Planta Daninha**, v.29, n.2, p.437-445, 2011.

DESAI, J. D.; DESAI, A. J. **Biosurfactants: production, properties, applications**. Ed. Nain Kosaric, University of Western, Ontario: London, Canada, 1993. cap. 3, 504p.

DICK, D.P. et al. Química da matéria orgânica do solo. In: MELO, V.F. & ALLEONI, L.R.F., eds. **Química e mineralogia do solo**. Viçosa-MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2009. Cap.11, p.1-67.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos (Rio de Janeiro, RJ). **Manual de métodos de análise de solo**. 2. ed. rev. atual. Rio de Janeiro-RJ, 1997. 212p. (EMBRAPA-CNPS. Documentos, 1).

EUROPEAN WEED RESEARCH COUNCIL – EWRC. Report of 3 rd and 4 rd meetings of EWRC. Cittee of methods in weed research. **Weed Research**, v.4, n.1, p.88, 1964.

FASANELLA, C. C.; CARDOSO, E.J.B.N. Biorremediação. In: **Microbiologia do solo**. Piracicaba-SP: ESALQ, 2016. Cap.13, p.197.

FERRAÇO, M. et al. Efeito da densidade populacional de *Canavalia ensiformis* na fitorremediação de solo contaminado com sulfentrazone. **Revista Ciência Agronômica**, v.48, n.1, p.32-40, 2017.

FERREIRA, Daniel Furtado. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência Agrotecnica**. [online]. 2014, vol.38, n.2 [citado 2015-10-17], p.109-112. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001>. Acesso em: 08 set. 2016

FOLEY, Jonathan A. et al. Solutions for a cultivated planet. **Nature**, v.478, n.7369, p.337-342, 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). 2050: A escassez de água em várias partes do mundo ameaça a segurança alimentar e os meios de subsistência. Roma, 2016. Disponível em: <https://www.fao.org.br/2050eavpmasams.asp>. Acesso em: 08 set. 2016.

FRANCO, L. O.; MAIA, R. C. C.; PORTO, A. L. F. Remoção de metais pesados por quitina e quitosana isoladas de *Cunninghamella elegans*. **Brazilian Journal Microbiology**, v.35, n.3, p.243-247, 2004.

GANDINI, E.M.M. **Capacidade competitiva, seletividade de herbicidas e atividade microbiana rizosférica de mudas de *Hymenaea courbaril* L.** 45p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina-MG, 2011.

ISLAM, K.R.; WEIL, R.R. Microwave irradiation of soil for routine measurement of microbial biomass carbon. **Biology and Fertility of Soils**, v.27, n.4, p.408-416, 1998.

KANE, D.J. et al. Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. **Science**, v.262, n.5137, p.1274-1277, 1993

KLINGMAN, G.C. et al. **Weed Science: principles and practices**. New York-EUA: John Wiley, 1975. 431p.

LEONEL, L. V. et al. Biorremediação do solo. **Terra e cultura** – n.51, ano 26, 2010.

MADALÃO, J. C. et al. O herbicida sulfentrazone interfere na biomassa microbiana e na atividade da microbiota do solo. **Revista Ciências Agrárias**, v.59, n.1, p.54-59, 2016.

MADALÃO, J. C. et al. Selection of species tolerant to the herbicide sulfentrazone with potential for phytoremediation of contaminated soils. Semina: **Revista Ciências Agrárias**, v.33, n.6, p.2199-2214, 2012 a.

MADALÃO, J. C. et al. Uso de leguminosas na fitorremediação de solo contaminado com sulfentrazone. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.42, n.4, p.390-396, 2012 b.

MARTINEZ, C.O. et al. Microbial degradation of sulfentrazone in a Brazilian rhodichapludox soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, n.1, p.209-217, 2010.

MARTINEZ, C. O. et al. Degradation of the herbicide sulfentrazone in a Brazilian Typic Hapludox soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.40, n.4, p.879-888, 2008.

MARTINS, P. F.; AZEVEDO, R. A. **Perspectivas do uso de microrganismos na biorremediação**. Disponível em:

<http://www.genetica.esalq.usp.br/pub/seminar/PFMartins-200701-Resumo.pdf>

Acesso em: 10 out. 2016.

MELO, I. S. et al. **Microbiologia Ambiental**. 2.ed. rev. e ampl. – Jaguariúna-SP: EMBRAPA Meio Ambiente, 2008. 647p.

MELO, C. A. D. et al. Lixiviação de sulfentrazone, isoxaflutole e oxyfluorfen no perfil de três solos. **Revista Planta Daninha**, v.28, n.2, p.385 - 392, 2010.

MENEGHETTI, L. R. R. Biorremediação na descontaminação de um solo residual de basalto contaminado com óleo diesel e biodiesel. Dissertação de Mestrado. 112 p. Programa de Pós-Graduação em Engenharia. Departamento de Engenharia Civil. Universidade de Passo Fundo-RS: UPF, 2007.

MONQUERO, P. A. et al. Lixiviação e persistência dos herbicidas sulfentrazone e imazapic. **Revista Planta Daninha**, v.28, n.1, p.185 - 195, 2010.

MONTEIRO, R. T. R. Biodegradação de herbicidas. In: EMBRAPA – CNPMA. **Workshop sobre biodegradação**. Anais... Campinas-SP, p.120-128, 1996.

MORENO, J. L. et al. Effects of atrazine on microbial activity in semiarid soil. **Applied Soil Ecology**, v.35, n.1, p.120-127, 2007.

MUYZER, G., et al. Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR amplified 16S rDNA – A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. In: Akkermans ADL, van Elsas JD & de Bruijn FJ (Eds) **Molecular Microbial Ecology Manual**, p.1–23. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1996.

OHMES, G.A.; MUELLER, T.C. Sulfentrazone Adsorption and Mobility in Surface Soil of the Southern United States. **Weed Technology**, v.21, n.3, p.796-800, 2007.

OLIVEIRA, M. F.& BRIGHENTI, A. M. Comportamento dos herbicidas no ambiente. In: OLIVEIRA JÚNIOR, R. S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M. H. **Biologia e manejo de plantas daninhas**. Curitiba-PR: Omnipax, 2011. p.263-304.

PARÁIBA, L. C. et al. Evaluation of soil temperature effect on the herbicide leaching potential into groundwater in the brazilian cerrado. **Chemosphere**, v.53, n.9, p.1087-1095, 2003.

PIRES, F. R. et al. Fitorremediação de solos contaminados por herbicidas. **Revista Planta Daninha**, v.21, n.2, p.335-341, 2003.

PIRES, F. R. et al. Inferências sobre atividade rizosférica de espécies com potencial para fitorremediação do herbicida tebuthiuron. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.29, n.4, p.627-634, 2005.

PIRES F. R. et al. Adubos verdes na fitorremediação de solos contaminados com o herbicida tebuthiuron. **Revista Caatinga**, v.19, n.1, p.92-97, 2006.

PIRES, F. R.; EGREJA FILHO, F. B.; PROCÓPIO, S. O. **Inferências sobre mineralogia dos solos, sorção e fitorremediação de herbicidas**. In: FERREIRA, A.; LIMA, A. B. P.; MATTA, F. P.; AMARAL, J. A. T.; LOPES, J. C.; PEZZOPANE, J. E. M.; FERREIRA, M. F. S.; POLANCZYK, R. A.; SOARES, T. C. B. (Ed.). *Tópicos Especiais em Produção Vegetal I*. 1. ed. Vitória-ES: EDUFES, 2009. p.391-406

PROCÓPIO, S. O. et al. Fitorremediação de solo contaminado com picloram por capim-pé-de-galinha-gigante (*Eleusine coracana*). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, n.6, p.2517-2523, 2008.

PROCÓPIO, S. de O. et al. **Fitorremediação de solos com resíduos de herbicidas**. Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju-SE, 2009. 32p.

QUEROL, X.; ALASTUEY A.; MORENO, N. Immobilization of heavy metals in polluted soils by the addition of zeolitic material synthesized from coal fly ash. **Chemosphere**, v.62, n.2, p.171-180, 2006.

RODRIGUES B.N. & ALMEIDA F.S. **Guia de herbicidas**. 6ª ed. Londrina-PR, Edição dos Autores, 2011. 697p.

ROVIRA, A. D. Plant root exudates and their influence upon soil microorganisms. In: BAKER, K. F.; SNYDER, W. C. (Eds.). **Ecology of soil-borne plant pathogens prelude to biological control**. Berkeley: University of California Press, 1965. p.170-185.

SANTOS, E. A. Atividade rizosférica de solo tratado com herbicida durante processo de remediação por *Stizolobium aterrimum*. **Pesquisa Agropecuária tropical**, v.40, n.1, p.1-7, 2010.

SANTOS, L.B.O.; INFANTE, C.M.C.; MASINI, C. Determination of picloram in Waters by sequential injection chromatography with UV detection. **Journal of Brazilian Chemical Society**. v.21, n.8, p.1557-1562, 2010b.

SANTOS, E. A. et al. Fitoestimulação por *Stizolobium aterrimum* como processo de remediação de solo contaminado com trifloxysulfuron-sodium. **Revista Planta Daninha**, v.25, n.2, p.259 - 265, 2007.

SANTOS, J. B. et al. Fitorremediação do herbicida trifloxysulfuron sodium. **Revista Planta Daninha**, v.22, n.2, p.223-330, 2004

SIGMAPLOT. **Exact Graphy for Exact Science**. Version 11.0, 2008.

SILVA, A. et al. Herbicidas: comportamento no solo. In: SILVA, A.; SILVA, J. F. (Eds.). **Tópicos em manejo de plantas daninhas**. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa, 2007. p.189-248.

STOTZKY, G. Microbial respiration. In: BLACK, C.A., ed. *Methods of soil analysis*. Madison, **American Society of Agronomy**, 1965. p.1551-1572.

SUZUKI, M.T., GIOVANNONI, S.J. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. **Applied Environmental Microbiology** v.62, n.2, p.625-630, 1996

TEDESCO, M.J.et al. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. 2 ed. Porto Alegre-RS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 174p.

VANCE, E.D.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology and Biochemistry**, v.19, n.6, p.703-707, 1987.

VIEIRA, R. F.; SILVA, C. M. M. S.; SILVA, A. P. D. Soil microbial biomass C and symbiotic processes associated with soybean after sulfentrazone herbicide application. **Plant Soil**, v.300, n.1, p.95-103, 2007.

VIVIAN, R. et al. Persistência de sulfentrazone em Latossolo vermelho-amarelo cultivado com cana-de-açúcar. **Revista Planta Daninha**, v.24, n.4, p.741-750, 2006.

WALKER, T. S. et al. Root exudation and rhizosphere biology. **Plant Physiology**, v.132, n.1, p.44–51, 2003.

Conclusão Geral

Este estudo permitiu concluir que diversos fatores interferem no desempenho da fitorremediação de herbicidas no solo, em particular a mineralogia e a atividade microbiana. Os resultados encontrados demonstraram que a movimentação do herbicida foi maior no solo caulínítico e sua retenção maior no solo hematítico. A fitorremediação foi mais eficiente no pré-cultivo da *C. ensiformis* no solo gibbsítico, reduzindo em 28% a carga de sulfentrazone aplicada. Não houve resultado para o solo hematítico, a análise de cromatografia revelou que toda massa aplicada ficou retida na profundidade 0-12 cm. No solo caulínítico, a *C. juncea* reduziu a massa total de sulfentrazone em aproximadamente 19%. Os resultados também indicaram que o cultivo das espécies fitorremediadoras promoveu incremento da atividade microbiana e pela análise de sua diversidade, utilizando a técnica PCR-DGGE, foi capaz de detectar na microbiota do solo, diferenças genéticas na atividade rizosférica entre as duas espécies de adubos verdes, ampliando os conhecimentos a respeito das associações entre as plantas e microrganismos. Há necessidade de avanço nos estudos, sobretudo na identificação desses microrganismos.

2. APÊNDICE

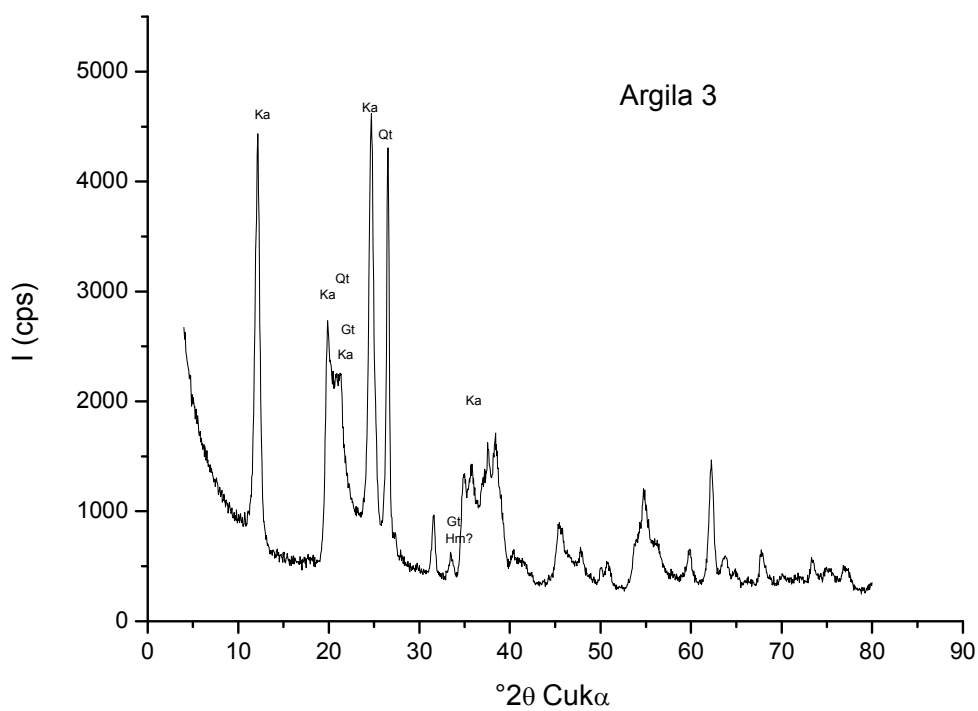


FIGURA 1: Difratoograma de argilas naturais do solo caulinítico. Ka = caulinita; Gt= goethita; Hm = hematita; Qt = quartzo.

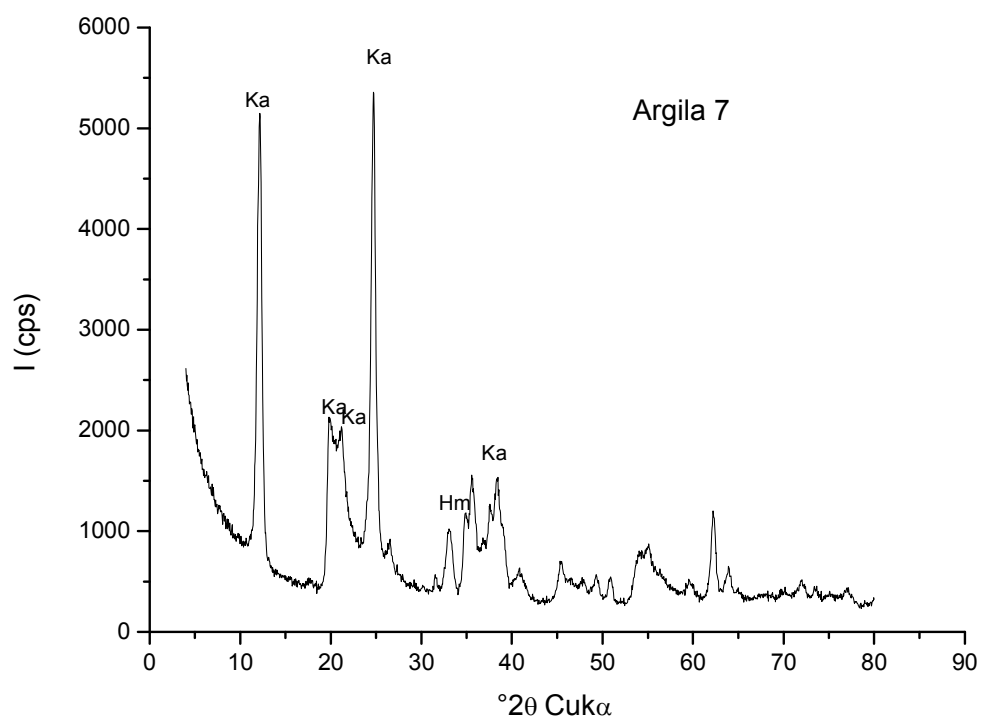


FIGURA 2: Difratoograma de argilas naturais do solo hematítico. Ka = caulinita; Hm = hematita.

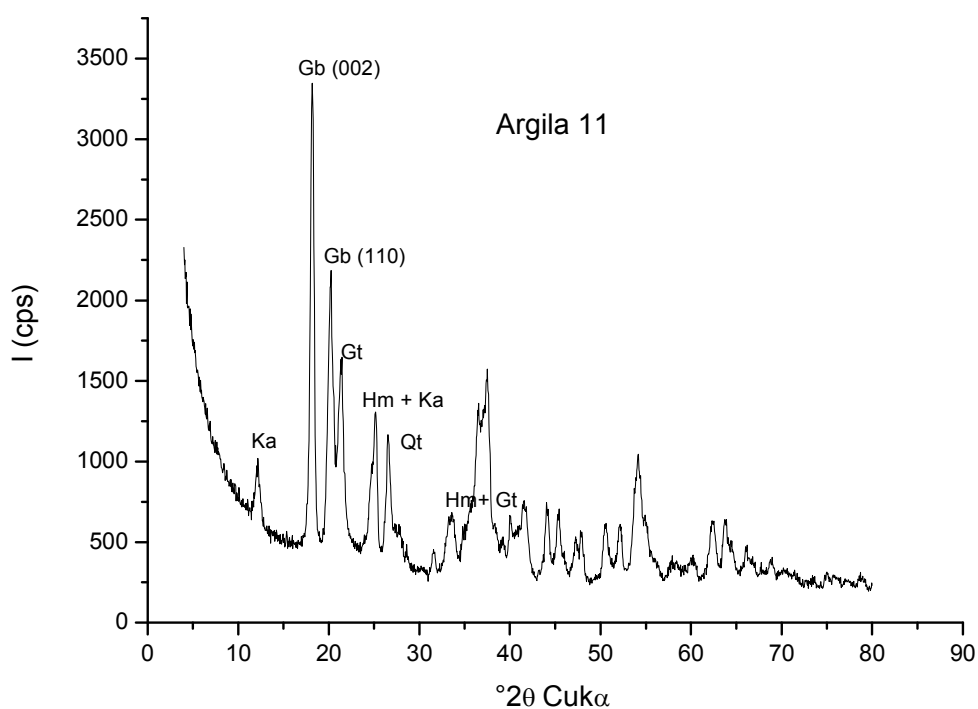


FIGURA 3: Difratoograma de argilas naturais do solo gibbsítico. Ka = caulinita; Gb = gibbsita; Gt = goethita; Hm = hematita; Qt = quartzo.